

**Philipps**



**Universität  
Marburg**

Fachbereich Biologie  
-Entwicklungsbiologie-

**Die Rolle von Blow und Drp1 bei der Auflösung des  
Präfusionskomplexes am Zell-Zell Kontakt während  
der Myoblastenfusion von *Drosophila***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. Nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von

Michaela Papendieken  
aus Ruttershausen

Marburg/Lahn, 2019

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

Als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter/in: Dr. Susanne-Filiz Önel

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am:

*Für meine Mutter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	Die larvale Körperwandmuskulatur von <i>D. melanogaster</i> entsteht durch die Fusion von FC und FCM.....	5
1.2	Die Entwicklung der adulten indirekten Flugmuskulatur.....	7
1.3	Die Fusion von FC und FCMs kann auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene in zwei Phasen unterteilt werden.....	8
1.4	Proteine der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln die Zell-Erkennung und Adhäsion der Myoblasten .....	10
1.5	Die Ausbildung des Aktinfocus während der Myoblastenfusion wird durch eine Vielzahl von Aktinregulatoren kontrolliert .....	11
1.6	Blow ist essentiell für das Voranschreiten der Myoblastenfusion und spielt eine Rolle bei der Etablierung des Präfusionskomplexes .....	15
1.7	Die FuRMAS in <i>Drosophila</i> weisen Ähnlichkeiten zur immunologische Synapse auf	16
1.8	Swiposin-1 und Syk sind in Vertebraten an der Aktivierung des B cell receptors (BCR) beteiligt .....	18
1.9	DSwip-1 und Shark lokalisieren am Zell-Zell Kontakt und scheinen eine Rolle während der Myoblastenfusion zu haben .....	18
1.10	Die Relokalisation von Mitochondrien während der Zell-Kommunikation ist sowohl in der immunologischen- als auch neurologischen Synapse von Bedeutung .....	20
1.11	Drp1 ist ein Hauptregulator der mitochondrialen Teilung und lokalisiert in der IS und der neurologischen Synapse die Mitochondrien an den Zell-Zell Kontakt.....	21
1.12	Ziele der Arbeit .....	23
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
2.1	Verwendete Chemikalien .....	25
2.2	Verwendete Geräte .....	25



2.2.1	Mikroskope .....	25
2.2.2	Weitere Geräte .....	26
2.2.3	Kits und Sonstiges .....	26
2.2.4	Verwendete Enzyme .....	27
2.2.5	Antibiotika und Stocklösungen .....	27
2.2.6	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	28
2.2.7	Medien und Platten .....	29
2.2.8	Bakterien- ( <i>Escherichia coli</i> ) und Hefestämme ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	30
2.2.9	Verwendete Antikörper .....	31
2.2.10	Verwendete cDNAs und Matrizen .....	31
2.2.11	Verwendete Oligonukleotide .....	32
2.2.12	Selbst generierte Primer .....	32
2.2.13	Verwendete Konstrukte .....	35
2.2.14	Fliegenstämme ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) .....	36
<b>2.3</b>	<b>Arbeiten mit dem Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39
2.3.2	<i>Drosophila</i> Kreuzungen .....	39
2.3.2.A	Balancerlinien und Mehrfachmarkierung von Chromosomen .....	39
2.3.3	Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie .....	40
2.3.3.A	Erzeugung einer Doppelmutante .....	41
2.3.3.B	Erzeugung von Rekombinanten .....	42
2.3.4	P-Element Keimbahntransformation durch Mikroinjektion .....	43
2.3.4.A	Prinzip einer Mikroinjektion .....	43
2.3.4.B	Mikroinjektion in <i>Drosophila</i> Embryonen .....	43
2.3.5	Etablierung transgener Fliegenstämme .....	44
2.3.5.A	Eine ektopische Expression von Genen mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems .....	44
2.3.6	Sammeln von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	45
2.3.7	Formaldehyd-Fixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	45
<b>2.4</b>	<b>Histologische Methoden .....</b>	<b>46</b>

2.4.1	Fluoreszenzantikörperfärbung an <i>Drosophila</i> Embryonen .....	46
2.4.2	<i>whole mount in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen .....	46
2.4.3	Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde mittels <i>in vitro</i> Transkription .....	46
2.4.4	Qualitätstest der DIG-markierten RNA-Sonden .....	47
2.4.5	<i>in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen .....	47
2.4.6	Herstellung von Dauerpräparaten .....	48
2.4.6.A	Herstellung von Dauerpräparaten mit Fluoromount-G <sup>TM</sup> .....	48
2.4.6.B	Einbettung in Epon .....	48
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.5.1	Primer Design .....	49
2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction).....	49
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	50
2.5.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach dem Handbuch des NucleoSpin® Kits 51	
2.5.5	Aufreinigung von DNA zum Injizieren von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	51
2.5.6	Aufreinigung von DNA über Ethanol-Präzipitation .....	51
2.5.7	DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer .....	52
2.5.8	Klonierung von PCR-Produkten in Topo-Vektoren .....	52
2.5.9	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 Ligase .....	53
2.5.10	Gateway Klonierung .....	53
2.5.11	Herstellung chemisch kompetenter DH5α Zellen .....	54
2.5.12	DNA-Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen .....	54
2.5.13	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	55
2.5.14	Plasmid-Isolation im präparativen Maßstab (Midi-Präparation) .....	55
2.5.15	Analytischer und präparativer Restriktionsverdau .....	56
2.5.15.A	Analytischer Restriktionsverdau .....	56
2.5.15.B	Präparativer Restriktionsverdau .....	56
2.5.16	Mutagenese-PCR mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen) .....	56
2.5.17	Sequenzierung von DNA .....	57

<b>2.6 Das Hefe Zwei-Hybrid System.....</b>	<b>58</b>
2.6.1 Das Prinzip des Hefe zwei Hybridsystems .....	58
2.6.2 Herstellung von Hefenährmedien .....	59
2.6.3 Anzucht der Hefekultur .....	59
2.6.4 Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (PEG/LiAc-Methode).....	60
2.6.5 Test der Kotransformanten auf Proteininteraktion.....	61
<b>2.7 Drosophila SL2 Zellkultur.....</b>	<b>61</b>
2.7.1 Stammhaltung und Passagieren von <i>Drosophila</i> SL2 Zellen .....	61
2.7.2 Transfektion von <i>Drosophila</i> SL2 Zellen .....	61
2.7.3 Formaldehyd-Fixierung und Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> SL2 Zellen.....	62
<b>2.8 Vertebraten Zellkultur .....</b>	<b>63</b>
2.8.1 Etablierung und Stammhaltung primärer Mausmyoblasten.....	63
2.8.2 Einfrieren und Auftauen primäre Mausmyoblasten.....	64
2.8.3 Differenzierung von primären Mausmyoblasten .....	64
2.8.4 Inhibitor Anwendung an primären Mausmyoblasten.....	65
2.8.5 Immunfluoreszenzfärbung von primären Mausmyoblasten.....	65
<b>2.9 Longitudinale und transversale Paraffinschnitte an adulter Flugmuskulatur .....</b>	<b>66</b>
2.9.1 Fixieren und Einbetten adulter Fliegen in Paraffin .....	66
2.9.2 Paraffindünnschnitte adulter Flugmuskeln .....	67
2.9.3 Hämatoxylin- und Eosinfärbung an Paraffindünnschnitten .....	67
2.9.4 Immunfluoreszenzfärbung an Paraffindünnschnitten .....	68
<b>2.10 Internet- Quellen.....</b>	<b>68</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1 Die Expression von Blow Deletionskonstrukten führt zu einem leichten Defekt in der Entwicklung der Muskulatur .....</b>	<b>69</b>
<b>3.2 Ein Hefe-2-Hybridsceen identifiziert die Tyrosinkinase Shark als potentiellen Blow Interaktionspartner .....</b>	<b>71</b>

<b>3.3 Eine Interaktion von Blow und Shark ist unabhängig von einer spezifischen Domäne von Shark .....</b>	<b>72</b>
<b>3.4 Eine Expression von Shark Deletionen führt zu einem Defekt während der Myoblastenfusion.....</b>	<b>77</b>
<b>3.5 Eine Expression von Shark scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung der adulten IFM zu haben .....</b>	<b>82</b>
<b>3.6 Zwischen Shark und Sns besteht eine genetische Interaktion .....</b>	<b>88</b>
<b>3.7 Der potentielle Blow Interaktionspartner Drp1 scheint an der Myoblastenfusion beteiligt zu sein.....</b>	<b>92</b>
3.7.1 Die GTPase Domäne von Drp1 scheint essentiell für die Vermittlung der Interaktion mit Blow zu sein	92
3.7.2 Zwischen Blow und Drp1 scheint auch eine genetische Interaktion vorzuliegen.....	98
3.7.3 Der Verlust der GTPase-Domäne von Shibire führt zu einem Defekt in der Formation der Muskulatur.....	100
3.7.4 Die Expression von Drp1 während der Myoblastenfusion führt zu leichten Fusionsdefekten	102
3.7.5 Drp1 scheint partiell in punktierte Strukturen in SL2 Zellen zu lokalisieren .....	109
3.7.6 Eine Expression von Drp1-Deletionen während der Entwicklung der adulten IFM scheint zu einem starken Defekt in der Etablierung der Sarkomerstruktur zu führen .....	113
3.7.7 Mitochondrien lokalisieren dynamisch während des Fusionsprozesses .....	121
3.7.8 Die Lokalisation von Drp1 und Mitochondrien in primären undifferenzierten und differenzierten Mausmyoblasten scheint dynamisch zu sein.....	129
3.7.9 Die Aktivität von Drp1 scheint für die Differenzierung von primären Mausmyoblasten essentiell zu sein.....	130
3.7.10 Der Verlust von Milton oder Marf führt zu beeinträchtigten Formation der Muskulatur .....	132
3.7.11 Die Expression von konstitutiv-aktiven Rab4 und Rab11 führt zu Defekten während der Myoblastenfusion .....	133
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>136</b>
<b>4.1 Essentielle Domänen für die Funktion von Blow während der Zell-Zell Fusion..</b>	<b>137</b>

4.2 Die nRTK Shark ist an der Myogenese beteiligt und scheint genetisch mit Sns zu interagieren .....	141
4.3 Die GTPase-Domäne von Drp1 scheint essentiell für die Interaktion von Drp1 und Blow zu sein.....	146
4.4 Eine Relokalisation von Mitochondrien spielt in einigen zellulären Prozessen eine Rolle .....	148
4.5 Die Regulation von Mitochondrien scheint einen Einfluss auf den Fusionsprozess zu haben.....	153
4.6 Das Mitglied der Dynamin-Superfamilie Shibire spielt eine Rolle bei der Myogenese .....	156
4.7 Die Expression von Shark und Drp1 in der IFM führt zu Defekten der DLM ....	157
4.8 Zusammenfassendes Model .....	160
5 Literaturverzeichnis .....	163
6 Anhang .....	179
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	179
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	182
6.3 Danksagung .....	185
6.4 Erklärung gem. § 5 der Promotionsordnung .....	187
6.5 Lebenslauf.....	188

## Summary

In *Drosophila*, founder cell (FC) and fusion competent myoblasts (FCM) fuse during embryonic myogenesis to form the body wall musculature (Onel und Renkawitz-Pohl 2009). After the first fusion events an accumulation of electron-dense vesicles form the prefusion complex at the cell contact. A vesicularisation of opposing membranes occurs in order to incorporate the FCM into the FC/growing myotube. After recognition and adhesion a multimere signalling complex is established, called *fusion-restricted myogenic adhesive structure* (FuRMAS). One characteristic feature is the drastic reorganisation of F-actin at the cell-contact in FCM (Kesper et al. 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009).

The FCM-specific protein Blown fuse (Blow) is essential for myoblast fusion and is involved in the reorganisation on F-actin at the side of fusion (Jin et al. 2011; Schroter et al. 2004). Ultrastructural analysis of *blow*-Mutants show that they stop myoblast fusion during the establishment of the prefusion complex (Doberstein et al. 1997), whereas mutants of the F-actin reorganisation Wasp and Wip stop later during the vesicularisation of membranes (Berger et al. 2008; Massarwa et al. 2007). This raises the question, whether Blow coordinates f-actin formation and the release of electron-dense vesicles. A global yeast-2-hybrid screen identified Shark and Drp1 as newly potential interaction partner. In the present study the function of Shark and Drp1 during myoblast fusion was addressed.

By using the yeast-2-hybrid, system the region of interaction between Shark and Blow could not be specified. Expression of *shark*-deletions missing either the Ank-repeats or both SH2-domains indicate that Shark is involved in the fusion process. Expression of *UAS-shark*  $\Delta$  *kin-mcherry* in the adult flight muscles leading to distinct reduction in the average flight ability. This supports further the idea that Shark might be involved in myoblast fusion. Based on data of Syk the vertebrate homologue of Shark, during the B cell receptor (BCR) activation, it was analysed if there is a direct or genetic interaction between Shark and the IgSF Sns (Krocze et al. 2010). Yeast-2-Hybrid analysis could not identify an interaction but doses experiments with the double mutants showed a genetic interaction. Indicating a similar function of Shark as shown for the BCR activation.

The GTPase-domain of Drp1 could be shown in the yeast-2-hybrid system to be essential for the interaction between Drp1 and Blow. A dosage experiment on *drp1*<sup>1</sup>, *blow*<sup>2</sup>-double mutants indicates a genetic interaction between Drp1 and Blow. The expression of

*UAS-drp1 Δ GED-mcherry* in contrast to *UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* in the embryo and the adult flight muscles leads to a stronger defect. In this study it was shown that the inhibition of Drp1 function in primary mouse myoblasts via incubation with Mdivi-1 results in a dose dependant drastic reduction in fusion-efficiency. Indicating further an involvement of Drp1 during fusion.

Drp1 is a master regulator of mitochondrial division (Verstreken et al. 2005). A mitochondrial localisation study in *sns*<sup>20-15</sup>-, *duf*-, *rst*-, *sing*<sup>22</sup>-, *rols*<sup>117</sup>-, *kette*<sup>J4-48</sup> and *blow*<sup>2</sup>-mutants showed that mitochondria localise dynamic during fusion. During migration and early attachment mitochondria localise increased in the leading edge of the cell and the side of fusion, during late attachment the mitochondria vanished from the side of fusion.

The loss of *marf*, a gene involved in mitochondrial trafficking, leads to a distinct fusion defect. This indicates that the transport of mitochondria seems to be important for the fusion.

The expression of *UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry* indicates a role of the GTP hydrolysis during embryonic myogenesis.

Rab4 and Rab11 play a role during mitochondrial homeostasis (Caza et al. 2014; Landry et al. 2014). An expression of a full-length (fl), as well as a potential dominant-negative and constitutive-active *rab4*- and *rab11*-construct in the embryo results in lightly defects. An evidence of a potentially contribution of Rab4 and Rab11 in the mitochondrial homeostasis.

## Zusammenfassung

In *Drosophila* fusionieren während der embryonalen Myogenese Founderzellen (FC) und fusionskompetente Myoblasten (FCM) um die Körperwandmuskulatur zu bilden (Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Dabei kommt es nach den ersten Fusionen zur Ansammlung von elektronendichten Vesikeln an der Kontaktstelle, welche den Präfusionskomplex bilden. Nach Erkennung und Adhäsion der FC mit der FCM erfolgt die Etablierung eines multimeren Signalkomplexes, welcher als *fusion-restricted myogenic adhesive structure* (FuRMAS) bezeichnet wird. Eine kennzeichnende Eigenschaft dieser ist eine, auf Seiten der FCM, drastische Reorganisation von F-Aktin am Zellkontakt (Kesper et al. 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Das FCM-spezifische Protein Blown fuse (Blow) ist für die Myoblastenfusion essentiell und an der Reorganisation von F-Aktin am Zellkontakt beteiligt (Jin et al. 2011; Schroter et al. 2004). Ultrastrukturelle Analysen zeigen, dass *blow*-Mutanten während der Etablierung des Präfusionskomplexes stoppen wohingegen Mutanten für die F-Aktin Reorganisation Wasp und Wip erst während der Vesikularisierung der Membranen stoppen (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Massarwa et al. 2007). Dies wirft die Frage auf, ob Blow die F-Aktin Bildung und die Freisetzung der elektronendichten Vesikel koordiniert. Über einen globalen Hefe-2-Hybrid Screen wurden zwei neue potentielle Interaktionspartner Shark und Drp1 identifiziert. In dieser Studie wurde die Funktion von Shark und Drp1 während der Myoblastenfusion adressiert. Die Interaktion zwischen Shark und Blow konnte mit Hilfe von Hefe-2-Hybrid Interaktionstest nicht auf eine definierte Region des Proteins beschränkt werden. Defekte im Embryo bei der Expression von *shark*-Deletionen, denen entweder die Ank-Repeats oder beide SH-Domänen fehlen weisen darauf hin, dass Shark an der Fusion beteiligt ist. Eine Expression von *UAS-shark Δ kin-mcherry* in der adulten Flugmuskulatur führt zu einer deutlich reduzierten durchschnittlichen Flugfähigkeit. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Shark an der Myoblastenfusion. Basierend auf Daten zu Syk dem Vertebraten Homolog von Shark, während der B cell receptor (BCR) Aktivierung, wurde untersucht, ob eine direkte oder genetische Interaktion zwischen dem IgSF Sns und Shark besteht (Krocze et al. 2010). Eine direkte Interaktion konnte nicht gezeigt werden, allerdings scheint eine genetische Interaktion zu bestehen. Dies legt nahe, dass Shark ähnlich wie dies für die BCR Aktivierung gezeigt werden konnte, wirken könnte.



Die GTPase-Domäne von Drp1 ist essentiell für die Vermittlung der Interaktion zwischen Drp1 und Blow im Hefe-2-Hybrid System. Ein Dosisexperiment an *drp1<sup>1</sup>*, *blow<sup>2</sup>*-Doppelmutanten weist auf eine genetische Interaktion zwischen Drp1 und Blow hin. Auch führt die Expression von *UAS-drp1 Δ GED-mcherry* im Gegensatz zur Expression von *UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* im Embryo sowie während der Entwicklung der adulten Flugmuskulatur zu stärkeren Defekten. In vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Inhibition von Drp1 in primären Mausmyoblasten mittels Mdivi-1 Inkubation Dosis-abhängig zu einer drastischen Reduktion in der Fusionseffizienz führt. Dies liefert weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Drp1 während der Fusion.

Drp1 ist ein Hauptregulator der mitochondriellen Teilung (Verstreken et al. 2005). Eine Lokalisationsstudie der Mitochondrien Verteilung in *sns<sup>20-15</sup>*-, *duf*, *rst*-, *sing<sup>22</sup>*-, *rols<sup>117</sup>*- und *kette<sup>14-48</sup>*-Mutanten konnte zeigen, dass die Lokalisation dieser dynamisch während der Fusion verläuft. Mitochondrien lokalisieren während der Migration und einer frühen Anheftung der Myoblasten eher in der Spitze der Zelle und der Anheftungsstelle, während einer festen Adhäsion allerdings eher abseits von Zell-Zell Kontakt.

Der Verlust von *marf*, einem Gen, welches am Transport von Mitochondrien beteiligt ist führt zu einem deutlichen Fusionsdefekt. Dies deutet darauf hin, dass der Transport von Mitochondrien für die Fusion wichtig zu sein scheint.

Eine Expression von *UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry* weist darauf hin, dass möglicherweise die GTP Hydrolyse eine Rolle während der embryonalen Myogenese spielt.

Rab4 und Rab11 spielen eine Rolle in der Homöostase der Mitochondrien (Caza et al. 2014; Landry et al. 2014). Eine Expression von volle-länge (fl), sowie potentiell dominant-negativ und konstitutiv-aktiv wirkender *rab4*- und *rab11*-Konstrukte im Embryo führt zu leichten Defekten. Dies könnte ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von Rab4 und Rab11 an der Aufrechterhaltung der mitochondriellen Homöostase während der Fusion sein.

# 1 Einleitung

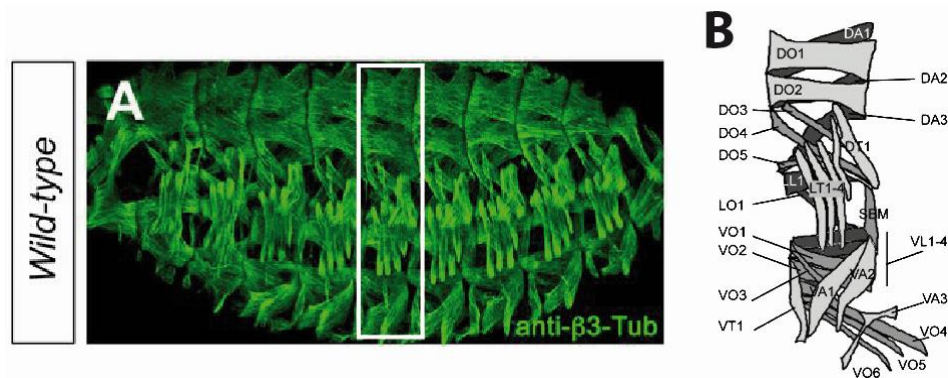
Die Zell-Zell Fusion spielt während der embryonalen Entwicklung von Geweben und Organen aber auch im adulten Organismus eine fundamentale Rolle. Dabei fusionieren mononukleäre Zellen gleicher oder verschiedener Zelltypen, nach erfolgreicher Zellerkennung und Adhäsion, miteinander um ein Synzytium zu bilden (Abmayr und Pavlath 2012; Martens und McMahon 2008; Oren-Suissa und Podbilewicz 2007).

Gut untersuchte Beispiele dafür sind: Die Verschmelzung von Eizelle und Spermium, zur Bildung einer diploide Zygote, die Einnistung des Embryos in die Gebärmutterwand durch die Fusion von Trophoblasten oder auch die Fusion von Osteoklasten und Makrophagen zur Bildung von Osteoklasten und Riesenzellen (Helming und Gordon 2009; Oren-Suissa und Podbilewicz 2007). Auch die Entwicklung der adulten Skelettmuskulatur in Säugetieren und Vertebraten entsteht durch Zell-Zell-Fusion. In Säugetieren ist die Myoblastenfusion ein lebenslanger Prozess und wichtig für das postnatale Wachstum sowie wichtig für eine Regeneration der Muskeln nach einer Verletzung. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* fusionieren während der Muskelentwicklung zwei Myoblastentypen miteinander um die adulte Körperwand- und die somatische Muskulatur zu bilden (Onel und Renkawitz-Pohl 2009; Rochlin et al. 2010). Die Myoblastenfusion ist ein fundamentaler Prozess während der embryonalen Entwicklung und ist auf zellulärer Ebene zwischen Vertebraten und *Drosophila* stark konserviert (Haralalka et al. 2011; Rochlin et al. 2010; Simionescu und Pavlath 2011). Auch viele in *Drosophila* identifizierte fusionsrelevante Proteine sind evolutionär konserviert. Dies macht *Drosophila* zu einem geeigneten Modelorganismus, um weitere Einblicke in die Entwicklung der Muskulatur im Detail zu erlangen (Krauss 2010; Onel und Renkawitz-Pohl 2009; Rochlin et al. 2010).

## 1.1 Die larvale Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* entsteht durch die Fusion von FC und FCM

Die larvale Muskulatur von *Drosophila* ist mesodermalen Ursprungs und entwickelt sich zwischen dem embryonalen Entwicklungsstadium 11 bis 15 (Rochlin et al. 2010) (Abb. 1A). Die Formation dieser nimmt etwa 5,5 Stunden in Anspruch, wobei eine einzelnen Fusion der Myoblasten durchschnittlich 12 Minuten in Anspruch nimmt (Beckett und Baylies 2007; Richardson et al. 2008; Richardson et al. 2007; Rochlin et al. 2010). Es werden drei Arten von

Muskeltypen im Embryo gebildet: Die syncytiale somatische Körperwand- und viszerale Darmmuskulatur sowie die mononukleäre Herzmuskulatur (Abmayr und Pavlath 2012; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Anders als bei Vertebraten besteht die Muskulatur von *Drosophila* dabei nicht aus vielen syncytialen Muskelfasern, die zu einem Muskel zusammengefasst werden, sondern aus syncytialen Myotuben, welche jeweils einem Muskel entsprechen (Bate 1990). Die somatische Muskulatur besteht aus einem repetitiven Muster aus 30 somatischen Muskeln pro Hemisegment (Abb. 1B).



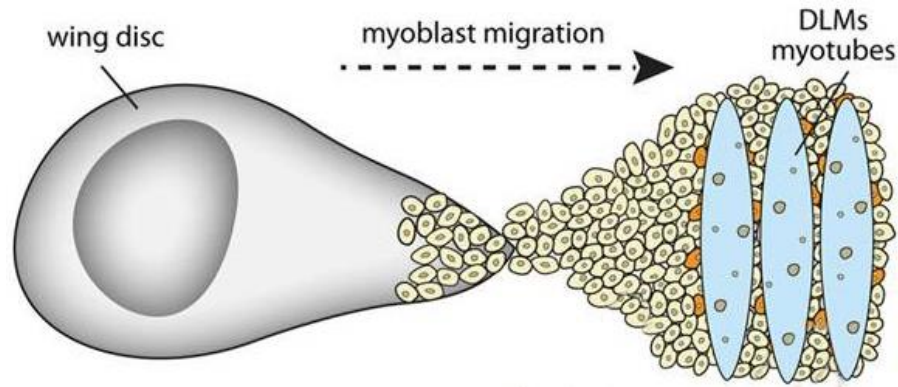
**Abb. 1: Aufbau der Körperwandmuskulatur in *D. melanogaster* und schematische Übersicht über alle Muskeln pro Hemisegment.** (A) Die hier mit Hilfe des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemachte Körperwandmuskulatur eines Stadium 16 Embryos zeichnet sich durch ein repetitives Muskelmuster aus. (B) Pro Hemisegment, markiert mit einem weißen Kasten, werden 30 verschiedene Muskeln an definierten Positionen ausgebildet (modifiziert nach Hamp et al. 2016 und Tixier et al. 2010).

Die Bildung der Muskulatur in *Drosophila* setzt die Fusion zwei verschiedener Myoblastentypen voraus, den Founderzellen (FC), welche die Lage, Form und Größe des entstehenden Muskels bestimmen und den fusionskompetenten Myoblasten (FCMs). Die FCMs liefern der wachsenden Myotube dabei die benötigte Masse, wobei sie nach der Fusion das transkriptionelle Schicksal der FC/wachsenden Myotube übernehmen. Ein fertiger Muskel kann dabei 4-24 Zellkerne enthalten (Beckett und Baylies 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009; Richardson et al. 2008; Rochlin et al. 2010). Die Determination von FC und FCM findet während der frühen Embryonalentwicklung statt. Mesodermale Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression der beiden basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren Twist (Twi) und Snail (Sna) aus (Baylies und Bate 1996; Morisato und Anderson 1995). Bereiche die eine hohe Expression von Twi aufweisen coexprimieren den bHLH Transkriptionsfaktor *Lethal-of-scute* (L'Sc), welcher

das myogene Cluster determiniert. Aus diesem Cluster geht mittels Notch- vermittelter lateralen Inhibition eine sogenannte Muskelprogenitorzelle hervor, welche im weiteren Verlauf zur FC differenziert (Baylies und Bate 1996; Bour et al. 2000; Carmena et al. 1995; Chen und Olson 2004; Paululat et al. 1999). In den umliegenden Zellen wird durch Notch der zur Gli-Superfamilie gehörende Transkriptionsfaktor *Lame Duck* (*Lmd*) exprimiert, welcher die FCMs determiniert (Duan et al. 2001; Rochlin et al. 2010; Tixier et al. 2010).

## **1.2 Die Entwicklung der adulten indirekten Flugmuskulatur**

Die Entwicklung der Flugmuskulatur während der Metamorphose erfordert ebenfalls die Fusion von Myoblasten. Die indirekte Flugmuskulatur (IFM) ist dabei ein gutes Model, um die Funktion oder Lokalisation von bestimmten Muskel-relevanten Proteinen zu untersuchen, da hier anderes als während der embryonalen Myogenese keine maternale Komponente mehr vorhanden ist. Die IFM kann in zwei Muskelgruppen aufgeteilt werden: den dorsal-longitudinalen Muskeln (DLM) und den dorso-ventralen Muskeln (DVM) (Roy und VijayRaghavan 1998). Während der Metamorphose durchlaufen annähernd alle larvalen Muskeln eine sogenannte Histolyse (Sink 2006). Ähnlich wie bei der embryonalen Myogenese der Körperwandmuskulatur entsteht auch die Flugmuskulatur durch Fusionen. Die meisten mehrkernigen adulten Muskeln entstehen aus einer FC, einige dagegen nutzen larvale Muskeln als Vorläuferzelle für weitere Fusionen. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Entstehung der DLMs. Dies sind zwölf im Thorax positionierte große Muskeln, die jeweils als sechser Gruppe lateral angeordnet sind. Dazu migriert eine Gruppe von adulten Myoblasten während der frühen Puppalstadien von der Flügelimaginalscheibe zu bestehenden larvalen Muskeln um mit diesen zu fusionieren (Fernandes et al. 1991) (Abb. 2).

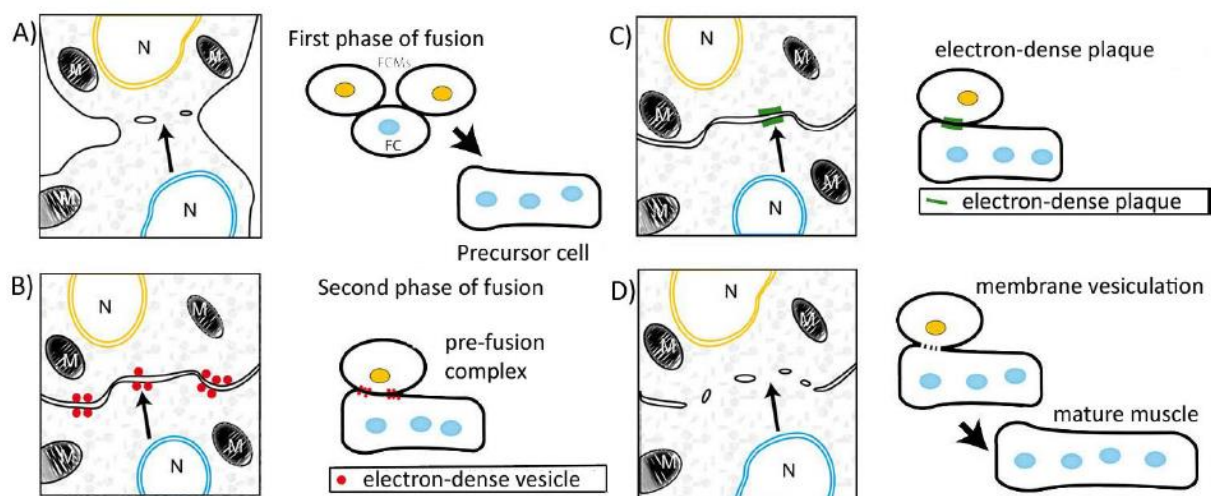


**Abb. 2: Schematische Übersicht über die Migration der Myoblasten von der Imaginalscheibe zu den Vorläuferzellen der DLM.** Adeptiheliale Myoblasten wandern während der Metamorphose von der Flügelimaginalscheibe zu den bereits vorhandenen larvalen Muskelprecursor um mit ihnen zu fusionieren (Gildor et al. 2012).

### 1.3 Die Fusion von FC und FCMs kann auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene in zwei Phasen unterteilt werden

Während der embryonalen Myogenese ist die Fusion der FCMs mit der FC/wachsenden Myotube ein wesentlicher Schritt zur Bildung des fertigen Muskels. Nach erfolgreicher Zell-Erkennung und –adhäsion, geht der Zellfusion zunächst eine Vesikularisierung der Membranen voraus bevor es zur Integration der FCM in die FC/wachsende Myotube kommt (Bate 1990; Rau et al. 2001). Mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskop-basierten (TEM) Mutantenanalysen konnte die Myoblastenfusion anhand von ultrastrukturellen Unterschieden in zwei zeitlich koordinierte Fusionsphasen eingeteilt werden (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Gildor et al. 2009; Kim et al. 2007). Zunächst fusionieren ein bis zwei FCMs mit einer FC um eine zwei bis drei-kernige Vorläuferzelle zu bilden, welche im zweiten Fusionsschritt nun so lange mit weiteren FCMs fusioniert bis die finale Größe des Muskels erreicht ist (Abb. 3A) (Bate 1990). Die Einteilung basiert auf der Beobachtung zweier Klassen von Fusionsmutanten: Einer Klasse in der keine Fusionen mehr stattfinden und einer Klasse bei der lediglich eine Vorläuferzelle mit zwei bis drei Kernen etabliert wird (Berger et al. 2008; Rau et al. 2001; Schroter et al. 2004). Zusätzlich ist der Fusionsprozess durch das Auftreten von verschiedene elektronendichten Strukturen charakterisiert (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Kim et al. 2007; Schafer et al. 2007). Während der zweiten Fusionsphase können an gegenüberliegenden Membranen zum einen elektronendichten Vesikel zum anderen auch elektronendichte Plaques beobachtet werden

(Abb. 3B, C). Die elektronendichten Vesikel akkumulieren an der Kontaktstelle beider Membranen und bilden den Präfusionskomplex (Abb. 3B). Es wird vermutet dass diese Vesikel vom Golgi-Apparat abstammen (Kim et al. 2007). Außerdem kommt es zur Ausbildung von elektronendichten Plaques (Abb. 3C) bevor es schließlich zur Vesikulierung der Membranen kommt (Abb. 3D). Die genaue Funktion der elektronendichten Strukturen ist dabei noch nicht genau bekannt. Es entstehen mehrere Fusionsporen entlang der adhärierenden Membranen, welche sich sukzessive weiten und schließlich die Inkorporation der FCM in die wachsende Myotube zulassen (Doberstein et al. 1997). In einer anderen Studie wurde die Formation Podosomen-ähnlicher Strukturen auf Seiten der FCM beschrieben, welche sich invasiv gegenüber der wachsenden Myotube während des Fusionsprozesses zeigen und mit Hilfe von F-Aktin die Fusion der Membranen ermöglicht. Es wurde postuliert, dass diese die Bildung der Fusionsporen begünstigt, da es dabei zu einer starken Beugung der Membranen kommt (Sens et al. 2010).

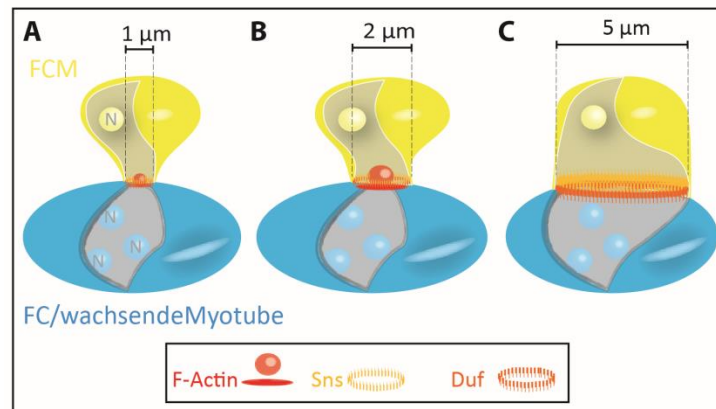


**Abb. 3: Schematische Darstellung der somatischen Myoblastenfusion auf ultrastruktureller Ebene.** (A) Während der ersten Phase der Fusion fusionieren ein bis zwei FCM (gelb) mit einer FC (blau) und bilden die Vorläuferzelle (Precursor cell). (B) In der zweiten Fusionsphase fusionieren weitere FCM mit der wachsenden Myotube bis der Muskel seine endgültige Größe erreicht hat. Während der zweiten Fusionsphase können elektronendichte Strukturen beobachtet werden. Zum einen paarweise angeordnete elektronendichte Vesikel an gegenüberliegenden Membranen. (C) Zum anderen elektronendichte Plaques, welche sich ebenfalls am Zellkontakt bilden. (D) Letztendlich findet eine Vesikulisierung der Zellmembran statt und die FCM fusioniert mit der FC/wachsenden Myotube. M markiert die Mitochondrien und N die Zellkerne (modifiziert nach Önel et al. 2011).

## 1.4 Proteine der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln die Zell-Erkennung und Adhäsion der Myoblasten

Die Migration, Erkennung und zellspezifische Adhäsion von FC/wachsender Myotube und FCMs wird durch Transmembranproteine der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) vermittelt. Diese besitzen in ihrer extrazellulären Domäne Ig-Schleifen, welche für die Adhäsion essentiell sind. Ihr intrazellulärer Bereich ist an der Weiterleitung des Fusionssignals beteiligt (Önel et al. 2011). In *Drosophila* sind vier IgSFs an der Zell-Erkennung und -Adhäsion beteiligt, welche auch als IRM (irre cell recognition module) bekannt sind. Dazu gehören Roughest/Irregular Chiasm C (Rst/IrreC), Dumbfounded/Kin of Irre (Duf/Kirre), sowie deren Interaktionspartnern Sticks and Stones (Sns) und Hibris (Hbs). (Artero et al. 2001; Bour et al. 2000; Fischbach et al. 2009). Rst/IrreC wird an der Oberfläche beider Myoblastentypen exprimiert und bildet Homodimere (Galletta et al. 2004). Dabei wirken die FC spezifisch exprimierten Adhäsionsmoleküle Rst/IrreC und sein Paralog Duf/Kirre redundant zueinander, da nur eine Deletion beider zu einem Stopp der Myoblastenfusion führt (Ruiz-Gomez et al. 2000; Strunkelnberg et al. 2001). Sns und sein Paralog Hbs dagegen werden FCM spezifisch exprimiert (Artero et al. 2001; Dworak et al. 2001). *sns*-Mutanten zeigen im Gegensatz zu *hbs*-Mutanten lediglich einen starken Fusionsdefekt, wohingegen *sns*, *hbs*-Doppelmutante vor dem zweiten Fusionsschritt stoppen. Das führt zur Annahme, dass eine partielle Redundanz zwischen Sns und Hibris herrscht, aber Hbs nicht essentiell für die Myoblastenfusion ist (Artero et al. 2001; Bour et al. 2000; Shelton et al. 2009). Erkennung und Adhäsion zwischen FC/wachsender Myotube und FCM führt zu einer ringförmigen Konzentration der IgSFs an der Zell-Kontaktstelle (Kesper et al. 2007; Önel et al. 2011; Sens et al. 2010). Der Adhäsionsring weitet sich dabei im Laufe des Fusionsprozesses und wächst dabei von anfänglich 1µm auf final 5µm. Dies entspricht in etwa der Größe einer FCM und weist darauf hin, dass die Fusion in diesem Bereich stattfindet (Kesper et al. 2007; Önel et al. 2011; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Die ringförmige Konzentration der IgSF am Zell-Kontakt ist dabei Bestandteil eines multiplen Proteinkomplex welcher auch als *fusion-restricted myogenic adhesive structure* (FuRMAS) bezeichnet wird und als zentraler Signalkomplex zu agieren scheint (Abb. 4) (Kesper et al. 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Die Etablierung der FuRMAS geht einher mit der drastischen und dynamische Reorganisation von filamentösen-Aktin (F-Aktin) am Zell-Kontakt (Kesper et al. 2007; Önel et al. 2011; Richardson et al. 2007). Daraus resultiert ein Aktin-Fokus auf Seiten der FCM und eine dünne Aktinschicht

auf Seiten der FC/wachsenden Myotube, begrenzt durch die ringförmig exprimierten Adhäsionsmoleküle. Es konnte außerdem die Rekrutierung von weiteren an der Fusion beteiligten Signalmolekülen zur Zellkontaktstelle beobachtet werden (Haralalka et al. 2011; Sens et al. 2010).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der FuRMAS.** (A) Nach erfolgreicher Zellerkennung und Adhäsion vermittelt durch die Mitglieder der IgSFs (unter anderem Sns und Duf) findet die Etablierung der Zellkommunikationsstruktur FuRMAS statt. (B) Dabei kommt es zu einer drastischen Reorganisation von F-Aktin, welches zu einem F-Aktin Fokus auf Seiten der FCM und einer dünnen F-Aktin Schicht in der FC/wachsenden Myotube kommt mit einer Rekrutierung von weiteren Signalmolekülen zum Zellkontakt. (C) Es bildet sich eine Fusionspore von initial 1µm bis zur finalen 5µm bevor es zur Integration der FCM in die FC/wachsenden Myotube kommt (modifiziert nach Önel et al. 2014).

### 1.5 Die Ausbildung des Aktinfocus während der Myoblastenfusion wird durch eine Vielzahl von Aktinregulatoren kontrolliert

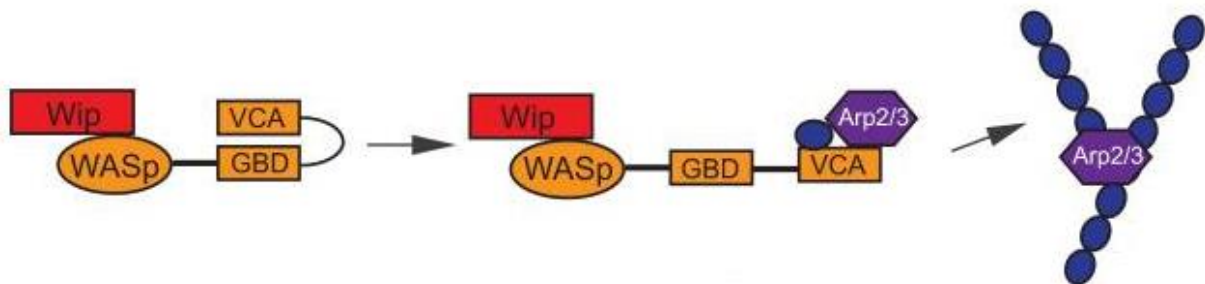
Die Analyse von Aktinregulatoren zeigt, dass die Reorganisation von F-Aktin am Zell-Kontakt nicht nur dynamisch verläuft, sondern auch essentiell für das Voranschreiten des Fusionsprozesse ist (Richardson et al. 2007). In Mutanten in denen die Polymerisation von verzweigtem F-Aktin gestört ist, bleibt eine vollständige Weitung der FuRMAS aus. Die Größe des Aktin Fokus bleibt auf 1µm beschränkt und Mutanten stoppen die Fusion an diesem Punkt (Kesper et al. 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Andere Studien weisen darauf hin, dass die Bildung der Podosomen-ähnlichen Strukturen ebenfalls auf der F-Aktin Polymerisation beruht (Jin et al. 2011; Sens et al. 2010). Die Bildung des verzweigtem F-Aktin wird durch den evolutionär



hochkonservierten Actin-related-protein 2/3 (Arp2/3)-Komplex eingeleitet, welcher in beiden Zelltypen benötigt wird (Berger et al. 2008; Richardson et al. 2007). Dieser bindet an bereits vorhandene Aktinfilamente und initiiert dort in einem 70° Winkel die Assemblierung neuer Filamente (Pollard et al., 2007; Chhabra et al., 2007). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplex wird durch kernbildungsfördernde Faktoren (nucleation promoting factors, NPFs) der Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Familie (WASp) genau kontrolliert (Park et al. 2007; Pollard 2007; Rotty et al. 2013). Zu diesen gehören WASp und der suppressor of cyclic AMP repressor (Scar), dem *Drosophila* Homolog von Wave (Berger et al. 2008; Gildor et al. 2009; Massarwa et al. 2007; Richardson et al. 2007; Schafer et al. 2007). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes erfolgt dabei über drei C-terminal evolutionär konservierte Motive, den sogenannten VCA-Modulen, welche sowohl WASp als auch Scar besitzen. Diese besteht aus zwei funktionalen Untereinheiten der V-Domäne, welche in der Lage ist Aktin Monomere zu binden und der CA-Domäne, welche den Arp2/3-Komplex bindet. Letzteres führt zu einer Konformationsänderung beider Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes und schließlich zu seiner Aktivierung (Robinson et al. 2001; Suetsugu 2013; Welch und Mullins 2002). WASp liegt normalerweise autoinhibiert, mit verdecktem VCA-Modul vor und kann durch die Bindung von aktive cell division cycle 42 (Cdc42) oder der kleinen GTPase Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) aktiviert werden (Campellone und Welch 2010; Kurisu und Takenawa 2009; Pollard 2007). WASp bildet mit dem FCM-spezifisch exprimierten WASp interacting protein (Wip) einen Komplex um den Arp2/3-Komplex zu aktivieren (Abb. 5) (Jin et al. 2011; Massarwa et al. 2007). Zusätzlich lokalisiert es WASp an die Zell-Kontaktstelle (Massarwa et al. 2007). Zelltypspezifische Rettungsexperimente konnten zeigen, dass Wasp FCM-spezifisch benötigt wird (Massarwa et al. 2007; Schafer et al. 2007). Basierend auf Kernzählungen von *wasp*- und *wip*-Mutanten kann davon ausgegangen werden, dass diese zusammen während der zweiten Fusionsphase benötigt werden (Berger et al. 2008; Kim et al. 2007; Massarwa et al. 2007; Schafer et al. 2007; Sens et al. 2010). Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass sowohl *wasp*- als auch *wip*-Mutanten während der Vesikularisierung der Membranen stoppen (Berger et al. 2008; Massarwa et al. 2007). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch WASp und Wip wird durch das FCM spezifisch exprimierte Blown fuse (Blow) weiter modifiziert. Blow ist in der Lage direkt an die WASp-bindende Domäne von Wip zu binden und so die Interaktion von WASp und Wip zu unterbrechen. WASp besitzt eine höhere Bindungsaffinität zu Wip als Blow,

was zu einer erneuten Interaktion von WASp und Wip führt. Durch die beständige Konkurrenz von WASp und Blow um Wip kommt es zu einer deutlich verstärkten Bildung von verzweigten F-Aktin am Zell-Zell Kontakt (Jin et al. 2011).

Der Arp2/3 Regulator Scar ist anders als WASp und Wip sowohl in Fc als auch FCM funktionell aktiv (Berger et al. 2008; Haralalka et al. 2011; Sens et al. 2010). Er ist Teil des pentameren Scar-Komplexes, welcher aus dem Abelson interactor protein (Abi), Kette/Nap1, Specifically Rac1-assosiated protein (Sra1) und dem Breast tumor kinase/hermatopoietic stem/progenitor cell protein 300 (Brk 1/Hspc300) besteht (Derivery und Gautreau 2010; Eden et al. 2002; Kurisu und Takenawa 2010).

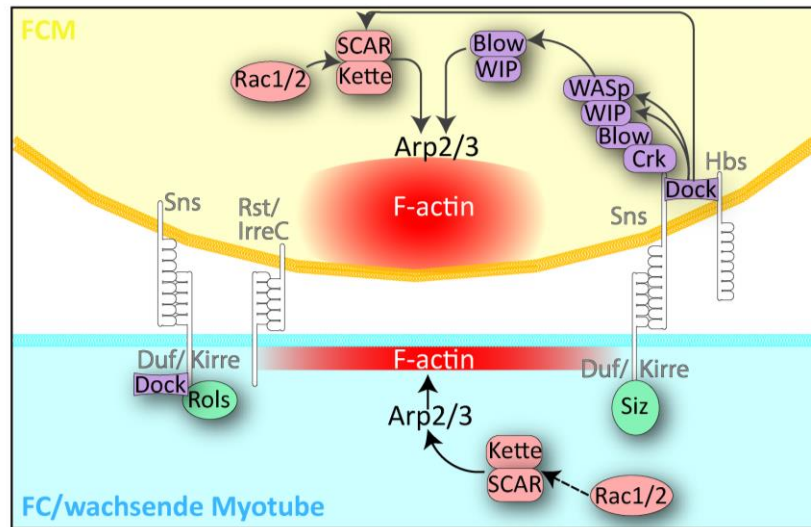


**Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des WASp/Wip Komplexes.** Der WASp NPF ist neben Scar auch in der Lage den Arp2/3-Komplex zu aktivieren. Dieser liegt inaktiv vor, wobei Wip WASp stabilisiert. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Proteins an die GTPase-binding domain (GDB), woraufhin die Freisetzung der VCA-Domäne erfolgt. Diese kann nun den Arp2/3 Komplex aktivieren (modifiziert nach Abmayr und Pavlath 2012)

Der Scar-Komplex wird durch die kleinen zueinander redundant wirkenden GTPasen Rac1 und Rac2 (im Folgenden vereinfacht als Rac beschrieben) durch die Bindung an Sra1 aktiviert (Campellone und Welch 2010; Kurisu und Takenawa 2010; Pollard 2007). An der Lokalisation und Aktivierung der kleinen GTPase Rac ist der guanine-nucleotide exchange faktor (GEF) Schizo/Loner beteiligt (Chen et al. 2003; Richardson et al. 2007). Interessanter Weise konnte gezeigt werden, dass Blow nicht nur über die WASp/Wip vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes beteiligt ist, sondern scheint auch an der Regulierung des Scar-Komplexes beteiligt zu sein, da eine genetische Interaktion mit Kette/Nap1 während der zweiten Fusionsphase nachgewiesen werden konnte (Schroter et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Verbindung der Zell-Adhäsion mit der F-Aktin Assemblierung. Dies kann über verschiedene Adapterproteine erfolgen, welche an die

intrazelluläre Domäne der Zell-Adhäsionsproteine binden (Bonn et al. 2013; Kaipa et al. 2013; Kim et al. 2007). Das SH2-SH3 Domänen Protein CT10 regulator of kinase (Crk), wirkt in FCMs als Adapterprotein und kann an die intrazelluläre Domäne von Sns binden (Kim et al. 2007). Außerdem ist es wahrscheinlich an der Rekrutierung von Blow zum Zellkontakt beteiligt und in der Lage mit Wip zu interagieren (Übersicht Abb. 6) (Jin et al. 2011; Massarwa et al. 2007). Allerdings konnten bis jetzt noch keine Mutanten Analysen durchgeführt werden, da Crk auf dem vierten Chromosom liegt und bis jetzt keine Mutanten dafür existieren. Ein weiteres Adapterprotein ist das SH2-SH3 Domänen Protein Dreadlocks (Dock), das *Drosophila* Homolog von Nck. Dock ist in beiden Myoblastentypen exprimiert und lokalisiert innerhalb der FuRMAS am Zellkontakt. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl mit Scar, WASp und Wip interagieren, als auch an die intrazelluläre Domäne der IgSFs binden kann (Kaipa et al. 2013). Ebenfalls in beiden Myoblastentypen exprimiert ist Schizo/Loner, welches unter anderem in der Lage an Duf/Kirre zu binden und aktiviert im weiteren Verlauf den ADP-ribosylation factor 6 (Arf6), was zu einer Aktivierung von Rac führt (Chen et al. 2003; Richardson et al. 2007). Funktionelle Analysen haben jedoch gezeigt, dass Schizo Arf1 aktiviert (Dottermusch-Heidel et al. 2012). In FCs wirkt zusätzlich das Multidomänenprotein rolling pebbles (Rols) als Adapterprotein. Es konnte gezeigt werden, dass Rols mit Duf/Kirre interagiert, was wahrscheinlich zur Aktivierung von Rac und so zur Aktivierung des Scar-Komplexes führt (Chen und Olson 2001; Erickson et al. 1997; Rushton et al. 1995).

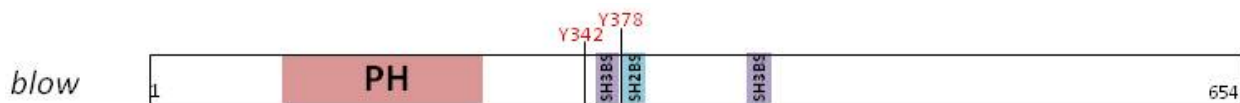


**Abb. 6: Zusammenfassender Überblick über an der Myoblastenfusion von *Drosophila* beteiligten Proteine.** Durchgezogene Pfeile zeigen eine bestätigte aktivierende Wirkung an, gestrichelte Pfeile zeigen dagegen eine vermutete, aber noch nicht bestätigte Interaktion an (modifiziert nach Önel et al. 2014).

## 1.6 Blow ist essentiell für das Voranschreiten der Myoblastenfusion und spielt eine Rolle bei der Etablierung des Präfusionskomplexes

Das Protein Blow übernimmt nicht nur eine entscheidende Funktion während der F-Aktin Reorganisation, sondern scheint weitere Funktionen während der Myoblastenfusion zu übernehmen. Es wurde erstmals von Doberstein (1997) beschrieben und bei einem Screen nach Mutationen der Axonbildung entdeckt, bei dem es außerdem Störungen bei der Myoblastenfusion zeigte. Sowohl während der somatischen als auch in der visceralen Myoblastenfusion spielt es eine Rolle, allerdings mit unterschiedlichen Funktionen. Es ist während der Entwicklung der visceralen Muskulatur an dem Auswachsen und Anheften der zirkulären visceralen Muskeln beteiligt, nicht aber bei deren Fusion (Schroter et al. 2006). Eine Expression ist erst während der embryonalen Entwicklungsstadien 10 bis 13 in den Clustern von mesodermalen Zellen detektierbar, welche während Stadium 11 bis 15 schwächer in den Myoblasten detektierbar sind (Schröter 2006; Sickmann 2010). Antikörperfärbungen an Embryonen zeigen, dass Blow FCM-spezifisch zunächst im Zytoplasma, nach erfolgter Zellerkennung und -adhäsion allerdings an der Stelle des Zell-Zell Kontakts innerhalb der FuRMAS lokalisiert (Kesper et al. 2007; Kim et al. 2007; Lin et al. 2009; Sens et al. 2010). Die Rekrutierung von Blow an die Stelle der Fusion hängt außerdem von dem IgSF Sns ab. So konnte in *sns*-Mutanten gezeigt werden, dass Blow

nicht mehr am Zellkontakt lokalisieren kann (Jin et al. 2011; Kesper et al. 2007). Blow besitzt eine Pleckstrin-homology-(PH)-Domäne, sowie zwei durch eine *in silico* Analyse festgestellte SH3 Bindestelle (BS), welche eine SH2 BS umschließen (Abb. 7). Dabei stellen SH3 Bindestellen Bindemotive für SH3 Domänen dar. Die SH2 BS können dagegen mit SH2 Domänen interagieren (Feller 2001; Sickmann 2010). Oft spielen Phosphorylierungsstellen und damit einhergehende Phosphorylierung eine Rolle bei der Interaktion von Proteinen. So wurden durch eine *in silico* Analyse zwei putative Phosphorylierungsstellen für Blow gefunden. Die Phosphorylierungsstelle an Position Tyrosin 342 (Y342) liegt kurz vor der ersten SH3 BS und die Phosphorylierungsstelle Y378 liegt kurz vor der SH2 BS (siehe Ab. 4) (Sickmann 2010). Jin et al. (2011) konnten über eine Coimmunopräzipitation von *Drosophila* SR+ Zellen zeigen, dass das Tyrosin an Stelle 378 essentiell für die Interaktion mit dem Adapterprotein Crk ist (Abb. 7). Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle verhindert eine Interaktion zwischen Blow und Crk. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression eines *blow* Konstruktes mit Aminosäureaustausch an der Position Y378F nicht in der Lage ist *blow*-Mutanten zu retten (Jin et al. 2011).



**Abb. 7: Schematische Übersicht über die Proteinstruktur von Blow.** Blow besitzt eine PH Domäne, sowie zwei potentielle SH3 Bindestellen (BS) und eine potentielle SH2 BS. Durch eine *in silico* Analyse wurde eine potentielle Phosphorylierungsstelle an der Position Tyrosin (Y) 342 gefunden. Außerdem besitzt es an Position Y378 eine Phosphorylierungsstelle, welche für eine Interaktion zwischen Blow und Crk essentiell ist.

## 1.7 Die FuRMAS in *Drosophila* weisen Ähnlichkeiten zur immunologischen Synapse auf

Die F-Aktin Reorganisation ist ein essentieller Prozess für das Voranschreiten der Fusion. Das Fehlen einzelner F-Aktin Regulatoren führt zu einem starken Fusionsdefekt. Betrachtet man diese auf ultrastruktureller Ebene wird deutlich, dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Fusionsprozesses stoppen. *kette*-Mutanten sind dabei nicht mehr in der Lage Fusionsporen zu etablieren (Hamp et al. 2016). *wasp*- als auch *wip*-Mutanten dagegen stoppen während der

Vesikularisierung der Membran (Berger et al. 2008; Massarwa et al. 2007). Im Vergleich dazu stoppen *blow*-Mutanten weitaus früher, schon während der Etablierung des Präfusionskomplexes, wobei eine Akkumulation elektronendichter Vesikel in der Nähe des Zellkontaktes zu beobachten ist (Doberstein et al. 1997).

Die Reorganisation von F-Aktin am Zellkontakt nach erfolgreicher Zell-Adhäsion ist nicht nur eine Eigenschaft des, während der Myoblastenfusion von *Drosophila* etablierten, Signalzentrums FuRMAS. Zusammen mit der ringförmige Anordnung von Zell-Adhäsionsmolekülen und einer Rekrutierung von Signalproteinen, sowie die starke Reorganisation von F-Aktin am Zell-Zell Kontakt weist die in Vertebraten beschriebene immunologische Synapse (IS) eine starke Ähnlichkeit zur FuRMAS auf (Kesper et al. 2007; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Die IS ist eine transiente Adhäsionsstruktur, welche zwischen einer T-Zelle (Dustin et al. 1998; Grakoui et al. 1999; Monks et al. 1998) oder B-Zelle (Batista et al. 2001) und ihrer verwandten Antigen-präsentierenden Zelle (APC) etabliert wird. Die Region der Zellerkennung und -adhäsion wird auch als central supramolecular activation complex (cSMAC) bezeichnet (Monks et al. 1998). Die Zellerkennung und -Adhäsion wird vom major histocompatibility class I und II (MHC I und II) sowie intracellular adhesion molecule-11 (ICAM-1) übernommen (Hiltbold et al. 2003). Es erfolgt eine massive Reorganisation von F-Aktin und des Mikrotubulinzytoskeletts innerhalb der cSMAC als auch eine rasche Rekrutierung von Signalproteinen wie zum Beispiel Tyrosinkinasen und deren Substrat (Babich et al. 2012; Griffiths et al. 2010; Oakes 2007). Das reorganisierte Mikrotubulizytoskelett erlaubt einen stabilen Transport von Vesikeln zum Zellkontakt (Lasserre und Alcover 2012). Außerdem ist während der Etablierung der IS eine Erhöhung in der zytoplasmatischen Calcium Konzentration in den T-Zellen beobachtet worden (Kummerow et al. 2009). Damit einhergehend ist ein wichtiger Faktor die Rekrutierung von Mitochondrien zum Zellkontakt, da gezeigt werden konnte, dass sie die lokale Akkumulation von Calcium reduzieren und so eine weitere Aktivierung von nachgeschalteten Signalen erlauben (Quintana et al. 2007). Eine Änderung in der intrazellulären Calcium Konzentration kann von Calcium-bindenden Proteinen wahrgenommen werden.

## 1.8 Swiprosin-1 und Syk sind in Vertebraten an der Aktivierung des B cell receptors (BCR) beteiligt

Ein Protein was in der Lage ist Änderungen in der Calcium Konzentration wahrzunehmen ist Swiprosin-1 (Swip-1). Es konnte gezeigt werden, dass es an dem B-Zell Rezeptor induzierten Calcium Einstrom beteiligt ist (Dutting et al. 2011; Hagen et al. 2012; Kroczeck et al. 2010). Erstmals entdeckt wurde es in humanen Lymphozyten (Vuadens et al. 2004). Es besitzt zwei EF-Hand-Domänen mit denen es in der Lage ist Calcium zu binden, sowie eine coiled-coiled Domäne (Vega et al. 2008). Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass die Calcium Konzentration einen Einfluss auf die Swip-1 induzierte Aktin-Bündelung hat (Kwon et al. 2013). Außerdem akkumuliert Swip-1 nicht nur in Aktin-reichen Regionen, sondern reguliert auch die Aktivierung von humanen Mastzellen über die Reorganisation von Aktin (Ramesh et al. 2009). Interessanterweise spielt Swip-1 in Vertebraten zusammen mit der spleen tyrosine kinase (Syk) eine Rolle während der B cell receptor (BCR) Aktivierung (Kroczeck et al. 2010). Swip-1 rekrutiert Syk zum Zellkontakt wo es zunächst Immunglobulin  $\alpha/\beta$  (Ig  $\alpha/\beta$ ) phosphoryliert und an Ig  $\alpha$  bindet (Kroczeck et al. 2010; Rolli et al. 2002; Wienands et al. 1998). Es folgt eine Rekrutierung und Phosphorylierung des Adaptorproteins SLP-65 (SH2 domain-containing leukocyte adapter protein of 65kDa) (Fu et al. 1998; Goitsuka et al. 1998; Wienands et al. 1998). Swip-1 dient im weiteren Verlauf als Gerüst für den BCR sowie für Syk, der Tyrosinkinase Lyn und der Phospholipase C  $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) (Kroczeck et al. 2010). Aktiviertes PLC $\gamma$ 2 induziert schließlich einen Calcium Ausstoß aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), welcher von sogenannten stromal interaction moleküle (STIM) Proteinen wahrgenommen wird und zu einer zweiten Welle von Calcium führt (Engelke et al. 2007; Feske et al. 2006). Dieser Prozess wird auch als store-operated calcium entry (SOCE) bezeichnet und ist essentiell für BCR Aktivierung (Dolmetsch et al. 1997). Eine Änderung in der intrazellulären Calcium Konzentration kann von Calcium-bindenden Proteinen wahrgenommen werden.

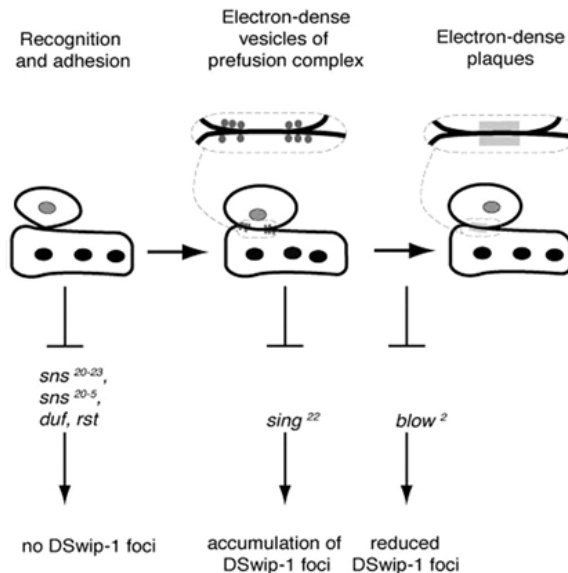
## 1.9 DSwip-1 und Shark lokalisieren am Zell-Zell Kontakt und scheinen eine Rolle während der Myoblastenfusion zu haben

In *Drosophila* konnte kürzlich ein Protein mit einer ähnlichen Proteinstruktur identifiziert werden: *Drosophila* Swiprosin-1 (DSwip-1) (Dutting et al. 2011; Hornbruch-Freitag et al. 2011).

Es wird während der Embryogenese in Magrophagen-ähnlichen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert (Estrada et al. 2006). Während der Myoblastenfusion zeigt es eine distinkte Lokalisation am Zellkontakt in FCMs (Hornbruch-Freitag et al. 2011).

Das *Drosophila* Homologe zu Syk ist die non-receptor tyrosin kinase (nRTK) Shark (Syk homologue SH2 domain ankyrin repeat kinase) (Mocsai et al. 2010; Scheib et al. 2012). Die Funktion von Shark ist während des embryonalen Dorsalschluss gut untersucht, da ein Fehlen von *shark* zu einem Dorsalschlussdefekt führt (Harden 2002; Heisenberg 2009). Es wurde außerdem eine Funktion im Nervensystem beschrieben, wo es an der Draper-vermittelte Glia Phagozytose im ZNS beteiligt ist (Logan et al. 2012; Ziegenfuss et al. 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass DSwip-1 und Shark *in vitro* miteinander interagieren. Außerdem führt der Verlust von *dswip-1* zu einer veränderten Lokalisation von Shark, da Shark nicht länger am Zellkontakt lokalisiert. Gleiches konnte in *sns*-Mutanten beobachtet werden, denen die intrazelluläre Domäne fehlt (Freitag 2013). Eine Phosphorylierung von Sns dagegen ist essentiell für die Weiterleitung des Fusionssignal (Kocherlakota et al. 2008). In *blow*-Mutanten konnte eine reduzierte DSwip-1 Foci beobachtet werden. Interessant ist außerdem, dass DSwip-1 in *singles bar-(sing)* Mutanten akkumuliert (Abb. 8; Hornbruch-Freitag et al. 2011). Sing gehört zur Gruppe der MARVEL Domänen Proteine und ist sowohl in FC als auch in FCM exprimiert. *sing*-Mutanten stoppen sehr früh während der Myoblastenfusion. In diesen Embryonen konnte außerdem eine signifikant erhöhte Menge an Präfusionskomplexen beobachtet werden (Estrada et al. 2007). In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass MARVEL Domänen Proteine eine Rolle beim Vesikeltransport spielen, was auf eine Funktion von Sing während der Exozytose der elektronendichten Vesikel hindeutet (Estrada et al. 2007; Sanchez-Pulido et al. 2002).





**Abb. 8: Übersicht über die Lokalisation von DSwip-1 in verschiedenen Mutanten.** DSwip-1 lokalisiert im Wildtyp an der Zell-Zell Kontakt. In *sns*<sup>20-23</sup>-, *sns*<sup>20-5</sup>- und *duf*, *rst*-Mutanten ist kein DSwip-1 Foci mehr zu detektieren. In *sing*<sup>22</sup>-Mutanten findet eine Akkumulation von DSwip-1 Foci statt. *blow*<sup>2</sup>-Mutanten stoppen die Fusion vor der Formation des Präfusionskomplexes bevor elektronendichte Plaques beobachtet werden können. Hier konnten kleiner und mehr diffuse ausgeprägte DSwip-1 Foci beobachtet werden (modifiziert nach Hornbruch-Freitag et al. 2011).

### 1.10 Die Relokalisation von Mitochondrien während der Zell-Kommunikation ist sowohl in der immunologischen- als auch neurologischen Synapse von Bedeutung

Nicht nur während der Etablierung der immunologischen Synapse konnte bislang eine Rolle von Mitochondrien beobachtet werden, auch an der neurologischen Synapse erfolgt unter bestimmten Umständen eine Relokalisation der Mitochondrien. Sie spielen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung neuronaler Integrität und deren Funktion, da eine Veränderung der mitochondrialen Dynamik oft mit neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht (Chen und Chan 2009; DiMauro und Schon 2008). Mitochondrien sind nicht nur die Kraftwerke der Zelle, die Energie in Form von ATP bereitstellen, sondern übernehmen weitere Funktionen, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung der Calcium Homöostase bei Etablierung der IS und spielen eine Rolle bei der Einleitung von Apoptose (Quintana et al. 2007). Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, welche konstanten Fusions- und Teilungsprozessen unterliegen. Eine

Störung in deren Regulation kann zu schwerwiegenden Defekten führen (Wang et al. 2017). An der Synapse werden je nach Stimulistärke unterschiedliche Pools synaptische Vesikel mobilisiert. Es gibt drei verschiedene Pools, den readily releasable pool (RRP), den recycling pool, sowie den reverse pool (RP) (Denker und Rizzoli 2010). Dabei kann man den RRP und RP auch als exo-endo cycling pool (ECP) zusammenfassen. Die Vesikel des RRP lokalisieren direkt an der aktiven Zone der Synapse und können nach einer Stimulation direkt in den synaptischen Spalt entlassen werden. Sobald der Vorrat dieser erschöpft ist, werden die Vesikel des recycling pools rekrutiert, dies geschieht meist durch eine moderate Stimulation. Bei einer sehr starken Stimulation werden schließlich auch die RP Vesikel freigesetzt (Denker und Rizzoli 2010; Vos et al. 2010). Es scheint einen Zusammenhang zwischen der Frequenz und/oder Intensität der Stimuli an der Synapse und der Anzahl der präsynaptischen Vesikel zu geben (Atwood und Wojtowicz 1986; Brodin et al. 1999; Dubinsky 2009; Nguyen et al. 1997). Nach einer starken Stimulation werden die am Aktinzytoskelett verankerten RT Vesikel freigelassen um die Freisetzung von Neurotransmitter am synaptischen Spalt zu gewähren. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig, welches von den Mitochondrien zur Verfügung gestellt wird. Allerdings spielt die Freisetzung von ATP zusätzlich eine Rolle bei der Calcium Speicherung des ER (Vos et al. 2010). Die hohe Konzentration an Calcium wiederum führt zu einer Aktivierung von Calcineurin, welches in der Lage ist das dynamin-related protein 1 (Drp1) durch eine Dephosphorylierung an Position S637 zu aktivieren (Cereghetti et al. 2008; Guerini 1997; Verstreken et al. 2005). Durch seine Aktivität als Schlüsselprotein bei der mitochondrialen Teilung, sorgt es für eine Relokalisation und Teilung der synaptischen Mitochondrien um eine konstante Energiebereitstellung zu gewähren (Verstreken et al. 2005). An der IS konnte ebenfalls eine Beteiligung von Drp1 an der Relokalisation von Mitochondrien nachgewiesen werden (Baixauli et al. 2011).

### **1.11 Drp1 ist ein Hauptregulator der mitochondrialen Teilung und lokalisiert in der IS und der neurologischen Synapse die Mitochondrien an den Zell-Zell Kontakt**

Mitochondrien unterliegen einem empfindlichen Gleichgewicht aus kontinuierliche regulierter Fusion und Teilung. Ein sehr gut untersuchter Hauptregulator der mitochondrialen Teilung ist die guanosin triphosphatase (GTPase) Drp1 (Smirnova et al. 2001). Viele Studien zeigen, dass die

Drp1-abhängige mitochondriale Teilung einen Einfluss auf die Gesundheit und das Wachstum von Zellen hat (Ikeda et al. 2015; Wakabayashi et al. 2009). Der Verlust von Drp1 führt zum Tod von Mäuse Embryonen am Tag 12,5 (Ashrafian et al. 2010). Auch gibt es Hinweise darauf, dass Drp1 essentiell für die neuronale Entwicklung, Funktion und den Bestehen ist, da Neuron-spezifische Drp1<sup>-/-</sup> Mäuse kurz nach der Geburt sterben. Dies kann auf Entwicklungsdefekte im Nervensystem zurückgeführt werden (Ishihara et al. 2009).

Drp1 ist ein Multidomänen Protein und besteht aus einer GTPase-Domäne, einer mittleren Aufbau-Domäne (MD), einer B-Domäne mit unbekannter Funktion und einer GTPase-Effektor-Domäne (GED) (Cho et al. 2013). Die Integrität der MD scheint dabei kritisch für den Aufbau der Tetramerstruktur und den Aufbau der höheren Struktur an der Membran zu sein (Ramachandran et al. 2007). Mutationen in der MD im Drp1 Hefe Ortholog Dnm1 unterbricht die Formation des Teilungskomplexes (Bhar et al. 2006; Naylor et al. 2006). Diese Daten weisen darauf hin, dass der MD abhängiger Aufbau sowohl wichtig für die Regulierung von Drp1 als auch mitochondriale Morphologie ist (Chang et al. 2010). Meist liegt Drp1 zytoplasmatisch exprimiert vor und muss aktiv transportiert werden (Verstreken et al. 2005). Nach erfolgter Aktivierung von Drp1 wird es an die äußere mitochondriale Membran (OMM) rekrutiert und formt dort eine multimere ring-ähnliche Struktur an mitochondrialen Teilungsstellen. Da es anders als andere GTPasen keine PH-Domäne besitzt, ist es nicht in der Lage direkt mit der Mitochondrien-Membran zu interagieren (Mears et al. 2011; Pagliuso et al. 2018). Daher bindet es an Rezeptoren wie mitochondrial fission factor (MFF) und fission protein 1 (FIS1) (da Silva et al. 2014). GTP-abhängig kommt es zunächst zu einer Einschnürung und schließlich zur Teilung der Mitochondrien (Hu et al. 2017). siRNA knockout Experimente in Zellkultur konnten kürzlich zeigen, dass Drp1 zusammen mit dem Vertebraten Dynamin 2 (Dyn2) bei der Teilung der Mitochondrien kooperiert (Lee et al. 2016).

Drp1 scheint nicht nur in der immunologischen sondern auch an der neurologischen Synapse an Relokalisation von Mitochondrien Richtung Zell-Kontaktstelle/Synaptischen Spalt beteiligt zu sein (Baixauli et al. 2011; Cereghetti et al. 2008; Verstreken et al. 2005). Beide Strukturen weisen Ähnlichkeiten zur *Drosophila* FuRMAS auf. An der neurologischen Synapse findet die Relokalisation der Mitochondrien Ca<sup>2+</sup>-abhängig statt. Ein hohes Aufkommen von Exo-Endozytose, basierend auf einer schnellen Umsetzung der exo-endo cycling pool-(ECP) und der reverse pool Vesikel an der aktiven Zone erhöht die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration stark (Vos et al.

2010). Dabei korreliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit der Frequenz und Intensität der ankommenden Aktionspotentiale in dem präsynaptischen Neuron (Dubinsky 2009; Nguyen et al. 1997; Vos et al. 2010). Bisher ist noch nicht bekannt inwieweit Drp1 oder seine Assoziation mit Mitochondrien einen Einfluss während der Myoblastenfusion hat. Möglicherweise könnte es aber direkt oder indirekt an der Auflösung des Präfusionskomplexes beteiligt sein, da für Is und neurologische Synapse bereits eine Beteiligung einer Drp1-abhängigen Relokalisation beschrieben wurde.

## 1.12 Ziele der Arbeit

Blow ist essentiell für die Myoblastenfusion. Es ist bekannt, dass es eine Rolle bei der Reorganisation von F-Aktin in FCMs spielt (Jin et al. 2011). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass *blow*<sup>2</sup>-Mutanten, anders als beispielsweise *wasp*- oder *wip*-Mutanten, früher während der Fusion stoppen (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Massarwa et al. 2007). Das wirft die Frage auf, ob die F-Aktin Polymerisation etwas mit der Fusion der elektronendichten Vesikel mit der Plasmamembran zu tun hat. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher beide, durch einen globalen Blow Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten potentiellen Interaktionskandidaten für Blow: Shark und Drp1, analysiert werden. Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, welcher Bereich von Shark und Blow für die direkte Protein-Protein Interaktion essentiell ist. Dafür wurden Deletionen von Shark und Blow erstellt und mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems auf Interaktion getestet. Des Weiteren sollte die Expression von *shark*-Deletionen im Embryo und der adulten Flugmuskulatur Aufschluss über die Rolle von Shark am Zellkontakt während der Fusion geben.

Auch sollte untersucht werden, ob Shark an der Signalweiterleitung über Sns beteiligt sein könnte. Dafür wurde zum einen untersucht, ob eine direkte Protein-Protein Interaktion und zum anderen ob eine genetische Interaktion vorliegt.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden inwieweit Drp1 eine Funktion während der Myoblastenfusion einnimmt. Zunächst sollte eine *in situ* Hybridisierung zeigen wo die Drp1 mRNA im Embryo lokalisiert. Es sollte des Weiteren bestimmt werden, welche Domäne von Drp1 und Blow für die Vermittlung der Interaktion essentiell ist. Dafür wurden Deletionen von *drp1* und *blow* mittels des Hefe-2-Hybrid Systems auf Interaktion getestet. Die Etablierung einer Rekombinanten sollte die Frage beantworten, ob zwischen Drp1

und Blow eine genetische Interaktion besteht. Es wurden *drp1*-Deletionen im Embryo und in der adulten Flugmuskulatur exprimiert, um Rückschlüsse auf die Rolle von Drp1 während der Myoblastenfusion zu erhalten. Basierend darauf, dass Drp1 ein Regulator der mitochondrialen Teilung ist, wurde die Lokalisation von *drp1*-Deletionen in SI2 untersucht. Es sollte so ein erster Eindruck gewonnen werden inwieweit Drp1 mit Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten assoziiert ist. Bislang ist noch unklar inwieweit Drp1 oder die Drp1-assoziierte Regulierung von Mitochondrien eine Rolle bei Myoblastenfusion spielt. Eine Mitochondrien unabhängige Funktion von Drp1 ist auch denkbar. So konnte eine Studie zeigen, dass Drp1 teilungs-unabhängig in der Lage ist Aktin zu binden (Ji et al. 2015). Zunächst sollte daher die Anwendung eines Drp1 Inhibitor an primären Mausmyoblasten Aufschluss darüber geben, ob sich Lokalisation der Mitochondrien während der Fusion verändert. Lokalisationsstudien von Mitochondrien in Mutanten in denen entweder die Signalweiterleitung, die Signalweiterleitung/Amplifizierung oder die F-Aktin Reorganisation gestört ist, sollten Aufschluss darüber geben, ob Mitochondrien an dem Fusionsprozess beteiligt sind. Im Zusammenhang damit wurden weitere mitochondrielle Regulatorproteine untersucht. Bislang ist außerdem unklar inwieweit Shibire, das Ortholog des klassischen Dynamins, in Redundanz zu Drp1 wirken könnte. Um die weitere Beteiligung von Shibire während der Myoblastenfusion zu untersuchen wurde eine *shibire*-Deletion im Embryo exprimiert.

Für Rab4 und Rab11 konnte eine Rolle in der Homöostase der Mitochondrien gezeigt werden (Caza et al. 2014; Landry et al. 2014). Daher sollte die Expression von volle-länge (fl), sowie potentiell dominant-negativ und konstitutiv-aktiv wirkender Rab4 und Rab11 Konstrukte im Embryo untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

AppliChem, Darmstadt  
Beckton, Dickinson and Company, Heidelberg  
Boehringer, Mannheim  
Fluka, Neu-Ulm  
Life Technologies, Darmstadt  
Merck, Darmstadt  
Roche, Mannheim  
Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, St. Louis

### 2.2 Verwendete Geräte

#### 2.2.1 Mikroskope

Binokulare

Stemi DV4, Zeiss, Jena  
Stemi SV11, Zeiss Jena  
Stemi SV2000-C, Zeiss Jena

Fluoreszenzmikroskop

AxioObserver Z.1 internes Mikroskop mit Apo-Tome, Zeiss Jena  
Konfokales Laser Scan Mikroskop TCS SP2, Leica Solms

Lichtmikroskop

Axioskop, Zeiss Jena

### 2.2.2 Weitere Geräte

Eismaschine	AF-20, Scotsman
Elektrophoresapparatur	Werkstatt der Philipps Universität Marburg
Heizblock Techne Dri-Biock	Wertheim
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco17, Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge Universal 320R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Magnet-Kochrührer	Variomag Mono H+P Labortechnik, München
Mikrowelle	Dimension 4, Panasonic
NanoDrop	2000 Spectrophotometer, Waltham, MA
PCR-Maschine Personal Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	pH 211, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	Gene Quant 1300, GE Healthcare, Freiburg
Schüttler GFL 3016	Biometra, Burgwedel
Spannungsquellen Biostep MP-300V	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Tischzentrifugen Biofuge Pico17	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Crosslinker UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Waldbronn
Vortexiergerät Mixer Uzusio VTX-3000L	LLC, Tokyo
Wasserbad GFL 1002	Biometra, Burgwedel
	Julabo 7AI, Seelbach

### 2.2.3 Kits und Sonstiges

DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche, Rotkreuz
Epoxidharz-Einbettungs Kit	Fluka, Neu-Ulm
Fluoromount-G <sup>TM</sup>	Biozol, Eching
FuGene HD Transfektions Kit	Promega, Mannheim
Glasperlen	Sigma-Aldrich, St. Louis
Hybond N-Membran	Amersham, Braunschweig
JETsorb Kit (Gelelution)	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Lachssperma DNA	Fluka, Neu-Ulm
Mass Ruler DNA-Ladder Mix #0403	MBI Fermentas, Heidelberg
MATCHMAKER Two-Hybrid System 3	Clontech-Takara Bio Europe
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey Nagel, Düren
pENTR <sup>TM</sup> Directional TOPQ <sup>®</sup> Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenese Kit	Agilent Technologie, Waldbronn
pCR II-TOPO <sup>®</sup> Cloning Kit Dual Promoter	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.2.4 Verwendete Enzyme

AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Alkalische Phosphatase (Cip)	Roche, Rotkreuz
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech,
RNase A	Boehringer, Mannheim
Sp6 -RNA-Polymerase	Roche, Rotkreuz
T3- RNA-Polymerase	Roche, Rotkreuz
T4- DNA-Ligase	MBI Fermentas, Heidelberg
T7- RNA-Polymerase	Roche, Rotkreuz
Taq-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen

### 2.2.5 Antibiotika und Stocklösungen

	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml Amp in 70% EtOH	100 µg/ml
BCI P/X-Phosphat	50 mg/ml BCIP in 100% DMF	
Chloramphenicol (Chl)	34 mg/ml in 70% EtOH	175µg/ml
EDTA	0,5 M	
Ethidiumbromid	10mg/ml	2µl/100ml
Heparin	50 mg/ml in EDTA, lösen bei 60°C	
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml Kan in H <sub>2</sub> O	50µg/ml
Lachssperma-DNA	10 mg/ml in 0,05 M Tris/HCl (pH 8,0)	
Phalloidin-TRITC	denaturieren bei 99°C, 10 min	
Proteinase K	1 mg/ml in 100 MeOH	
	20 mg/ml	
Rnase	50mg/ml	
X-α-Gal	20 mg/ml in 100% DMF	20µg/ml
Mdivi-1	3,3 µM/µl in DMSO	Nach Bedarf



## 2.2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

### Puffer

E1-Resuspensionspuffer	50mM Tris/HCL (pH 8,0), 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A,
E2-Lysepuffer	200mM NaOH, 1%SDS
E3-Neutralisationspuffer	3,1M Kac, mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen
E4-Äquilibriumspuffer	600mM NaCl, 100mM NaAc, 0,15% TritonX-100, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen
E5-Waschpuffer	800mM NaCl, 100mM NaAc, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen
E6-Elutionspuffer	1,5M NaCl, 100mM NaAc, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen
1 x NBT	1 M Tris/HCl (pH 9,5), 5 M NaCl, 1 M MgCl <sub>2</sub> , für in situ Hybridisierung mit 0,1% Tween20 versetzten
10x TBE	89mM Tris/HCl (pH8,2), 89mM Borsäure, 2mM EDTA
10 x PBS	1,3 M NaCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 x PBT	1 x PBS, 0,1 % Tween20
20x SSC	3M NaCl, 0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat (pH 7,0)
10 x TE	0,1M Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA

### Fixativ

4% F-PBS	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 1x PBS, lösen bei 60°C
----------	--

### Lösungen

1 %-Agarosegel in 1x TBE	1% (w/v) Agarose in 1 x TBE aufkochen und lösen, nach dem Abkühlen 2 µl/100 ml Ethidiumbromid Stocklösung 10 mg/ml)
10 x DNA-Auftragspuffer	0,1 % (w/v) Xylencylanol, 0,1% (w/v) Bromphenol blau, 80% Glycerin, 10% 10 x TBE

Epon	51,5% (w/v) Epon 812, 28% (w/v) Epon Härter DDSA,
	19% (w/v) Epon Härter MNA, 1,5% (w/v) Epon Beschleuniger DMP30
<i>in situ</i> -Hybridisierungslösung	50% Formamid, 5 x SSC, 100 µg/ml Lachssperma-DNA, 50 µg/ml Heparin, 0,1% Tween20
dNTP-Mix	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP
PEG-Puffer	100 mM LiAc, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50% PEG-3550
RFI	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM KAc, 10 mM CaCl <sub>2</sub> ,
	15% Glycerin, mit Essigsäure auf pH 5,8
RF II	10 mM MOPS, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl, 15% Glycerin,
	mit NaOH auf pH 6,8
PEG	Polyethylenglycol, 50% (w/v)
X-α- Gal	20mg/ml in 100% DMF

### 2.2.7 Medien und Platten

#### Drosophila Nähr- und Kulturmedien

Fruchtsaft-Agar	25% (w/v) Apfel- oder Traubensaft, 1,25% (w/v) Saccharose, 0,2% (w/v) Nipargin, 2,7% Select Agar
Maismehlagar	60% (w/v) Maismehl, 7,15% (w/v) Fructose, 1,2% (w/v) Trockenhefe, 60% (w/v) Malzextrakt, 0,14% (w/v) Nipargin, 0,7% (w/v) Select Agar, 0,6% (w/v) Propionsäure
LB-Medium (Luria-Bertani)	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 2% Bacto-Agar für LB-Platten

#### Hefe Zucht- und Selektionsmedien

YPDA-Platten	5% (w/v) YPD-Broth, 2% (w/v) Select Agar für YPDA außerdem 0,003% Adenin Hemisulfat zufügen als Anzuchtmedium den Agar weglassen
MATCHMAKER Two-Hybrid System 3:	
SD-His-Leu-Trp (Selektionsplatten)	6,7 g/l Yeast nitrogene base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10 x DO Solution, 10% (v/v) 10 x Ade, 2% (v/v) Glucose
SD-Ade-His-Leu-Trp+X- $\alpha$ -Gal (Induktionsplatten)	6,7 g/l Yeast nitrogene base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10 x DO Solution, 2% (v/v) Glucose, 20 $\mu$ g/ml X- $\alpha$ -Gal
<u>SL2 Zellen Medium</u> Schneiderzellmedium	Gibco <i>Drosophila</i> Medium, 5mg/ml Penicillin/Streptomycin, 10% FCS (hitzebeständig)
<u>Primäres Mausmyoblasten Medium</u> Complete Growth Medium	79% Hams F-10 20% Fetal Bovin Serum 2,5ng/ml rhFGF 1% Antibiotika/Antimykotika
Fusionsmedium	94% DMEM 5% Pferdeserum 1% Antibiotika/Antimykotika

## 2.2.8 Bakterien- (*Escherichia coli*) und Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

DH5a	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>
AH109	<i>MAT1a</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>LYS2::GAL1 UASGAL1 TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1</i> <i>UAS MEL1TATA-lacZ</i> (James et al. 1996) MATCHMAKER Two-Hybrid System 3, Clontech

### 2.2.9 Verwendete Antikörper

In folgender Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgelistet. Die Wahl der sekundären Antikörper richtet sich hierbei nach der Herkunft des primären Antikörpers.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Primäre Antikörper			
anti- $\beta$ 3-Tubulin	Meerschweinchen	1:10000	Buttgereit et al., 1996
anti- $\beta$ -Galaktosidase	Kaninchen	1:5000	Cappel, Hamburg
anti- $\beta$ PS2-Integrin	Maus	1:300	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa UAS
anti-CoxIV	Maus	1:1000	Abcam, Cambridge ab19234
anti-Drp1	Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge ab154879
anti-GM130	Kaninchen	1:300	Abcam, Cambridge ab30637
anti-Myc Tag	Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge ab19234
anti-RFP	Kaninchen	1:500	ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried
Sekundäre Antikörper			
anti-digoxigenin-AP (Fab-Fragment)		1:5000 (Sondentest), 1:2000 ( <i>in situ</i> Hybridisierung)	Roche, Mannheim
anti-Kaninchen-Cy2/Cy3/Cy 5	Ziege	1:300	Dianova, Hamburg
anti-Meerschweinchen-Cy2/Cy3	Ziege	1:300	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Cy5	Ziege	1:300	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Cy5	Ziege	1:300	Dianova, Hamburg

### 2.2.10 Verwendete cDNAs und Matrizen

Die cDNAs wurden von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) bezogen.

cDNA	Gen	Vektor	Bemerkungen
blowK	<i>blown fuse</i>	pUAST	Erzeugt aus genomischer DNA
LD41606	<i>shark</i>	pOT2	(Rubin et al. 2000)
AT04516	<i>drp1</i>	pOTB7	(Stapleton et al. 2002)

### 2.2.11 Verwendete Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden für PCR- und Sequenzierungsreaktionen verwendet und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

#### Vektorspezifische Sequenzierungsprimer

M13-for (Topo)	GTAAAACGACGGCCAG
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pUA3EC (pUAS <sub>t</sub> )	CTGCAACTACTGAAATCTGCC
pUAS5XB (pUAS <sub>t</sub> )	TCTCTGTAGGTAGTTTGTCC
pUAS-rfa-eGFP-rev	TGCAGATGAACTTCAGGGTC
pB42AD-for	CCTGACTGGCTGAAATCGAATGGT
3'AD (pGADT7)	TGTGCATCGTGCACCATCT
Sharkseqfw	CATGCCAAGGAGCTATTGGC
blowASseqfw	CGAAGTCGATGCCAAAGAGT
SharkSeqneufw	GCAGGTCAGTGGATCGGC

### 2.2.12 Selbst generierte Primer

Konstrukt	Primer	Vektor	Bemerkung
Gateway Konstrukte			
UAS-shark $\Delta$ kin-mcherry	sharkkingatewayfw CACCATGCTAGTGCTGGAT sharkpUAS <sub>t</sub> rev AATGTGAACCGTTTGCACCAATTCC	pUAS <sub>t</sub> mcherry	Sharkprotein ohne Kinase-Domäne
SharkDNterm-mcherry	GsharkDNtermfw CACCCCGCCACAGCCCA GsharkDNtermrev TTAAATGTGAACCGTTTGCAC	pUAS <sub>t</sub> mcherry	Cterminal Bereich von Shark

SharkDCterm-mcherry	GsharkDtermfw CACCATGAGTCGCGATAGTG GsharkDtermrev AACCGGATACTTGAGACTCAC	pUASt mcherry	Nterminale Bereich von Shark
SharkD2SH2-mcherry	GsharkD2SH2fw CACCATGCTGCATCGCGCCA sharkD2sh2rev TGGGCTGTGGCGGGTTGAGCAGGAA sharkD2sh2fw TTCCTGCTCAACCCGCCACAGCCCA GsharkD2SH2rev AATGTGAACCGTTTGCACCAA	pUASt mcherry	Ank-Repeats direkt an Interdomäne B, mittels einer Overlap-Extention PCR fusioniert. Enthält keine SH2- Domänen mehr.
SharkDAnk-mcherry	sharkpUASfw caccATGAGTCGCGATAGTG sharkDAnkrev TGGGAGCTTGTACAGATTGGTCAC sharkDAnkfw GTGACCAATCTGTACAAGCTCCCA sharkpUASrev AATGTGAACCGTTTGCACCAATTCC	pUASt mcherry	Beide SH2- Domänen direkt aneinanderfusioniert , mittels einer Overlap-Extention PCR. Enthält keine Ank Repeats mehr.
Drp1 fl-mcherry Drp1 fl-eGFP Drp1 fl-Myc	drp1-fw CACCATGGAGGCCCTAATTC drp1-rev CCACATGTGGGTCTCGCG	pUASt egfp, pUASp myc, pUASt mcherry	Drp1 full-lengh
Drp1T637D-mcherry	drp1T637Dfw ACGTCGCCTCgaTGACAAGGAGC drp1T637Drev GCTCCTTGTCAtcGAGGCGACGT	pUASt mcherry	Aminosäure Austausch von Treonin zu Phenylalanin an Position 637
Drp1DGED-mcherry	drp1-fw CACCATGGAGGCCCTAATTC drp1-DGED-rev GTCAGTGAGGCGACGTGG	pUASt mcherry	Drp1 ohne die GED- Domäne
Drp1DDyn-mcherry	Drp1-Ddyn-fw CACCCACATCGACGATCAG drp1-rev CGCGAGACCCACATGTGG	pUASt mcherry	Drp1 ohne die Dynamamin-Domäne
Hefe-2-Hybrid Primer			
SharkDkin pGADT7	sharkkinbamfw GGATCCatCTAGTGCTGG sharkkinADrev CTCGAGTCAGAAAACTCGG	pGADT7	Sharkprotein ohne Kinase-Domäne
Shark-kin1 pGADT7	sharkADkin1fw ctaGGATCCatCTAGTGCTGGATAG sharkADkin1rev gatCTCGAGATTTCTGGCGGCCA	pGADT7	1. Hälfte der Kinase Domäne von Shark
Shark-kin2 pGADT7	sharkADkin2fw gtaGGATCCatATATTGCTGACCGC sharkADkin2rev tgtCTCGAGGAAAACTCGGTGA	pGADT7	2. Hälfte der Kinase Domäne von Shark

Shark-kin pGADT7	sharkAD-kinfw gtaGGATCCatATGAGTCGCGATAG sharkAD-kinrev gatCTCGAGCTGGCTCAATAAAG	pGADT7	gesamte Kinase Domäne von Shark
Sharkkin pGBKT7	sharkkinBKADfw ggatccatATGCTAGTGCTG sharkkinBKrev gcggccgcGAAAACTCGG	pGBKT7	gesamte Kinase Domäne von Shark
SharkAnk pGADT7	sharkAnkBamfw ctaGGATCCatgCTGCATCGCG sharkAnkXhprev CTCGAGCTAGTTGAGCAGG	pGADT7	Ankyrin Repeats von Shark
SharkInterB pGADT7	sharkIntBfw GGATCCatCCGCCACAGC sharkIntBrev CTCGAGCTATTTTCTGGC	pGADT7	Inter B Bereich von Shark
SharkDNterm pGADT7	sharkDNtermfw GGATCCatATGCCGCCACAG sharkAD-kinrev gatCTCGAGCTGGCTCAATAAAG	pGADT7	C-terminaler Bereich von Shark
SharkDCterm pGADT7	sharkAD-kinfw gtaGGATCCatATGAGTCGCGATAG sharkDctermrev CTCGAGAACCGGATACTTGAG	pGADT7	N-terminaler Bereich von Shark
Drp1fl pGADT7	H-drp1DGEDADfw GAATTCATGGAGGCCCTAATTC H-drp1DDynADrev GGATCCCCACATGTGGGTCTCG	pGADT7	Drp1 full-lengh
Drp1DDyn pGADT7	H-drp1DDynADrev GGATCCCCACATGTGGGTCTCG H-drp1DDynADfw GAATTCACATCGACGATCAG	pGADT7	Drp1 ohne die Dynamin- Domäne
Drp1DGED pGADT7	H-drp1DGEDADfw GAATTCATGGAGGCCCTAATTC H-drp1DGEDADrev GGATCCGTCAGTGAGGCGA	pGADT7	Drp1 ohne die GED-Domäne
Blowfl pGADT7	blowDeltaM1M7fw CTCGAGATGAATCCGAAACC blowpBrev TCACCTTCTTGAGAAAGC	pGADT7	blow full lengh
BlowDCterm pGBKT7	blowDctermfw CATATGATGAATCCGAAACCAA blowDctermrev GAATTCctaTCCGCGGATGGCC	pGBKT7	N-terminale Bereich von Blow
BlowDNterm pGBKT7	blowDNtermfw CATATGGATGCTGGTGCTCAT blowDNtermrev GAATTCCTACACCTTCTTGA	pGBKT7	C-terminale Bereich von Blow

Sns it pGADT7	SNSitADEcoIfw GAATTCCATCAGCGCCGCAA SNSitADXhorev CTCGAGCTATACGAGGTGTC	pGADT7	intrazelluläre Bereich von Sns
Sns it pGBKT7	SNSitBKNdefw catatgCATCAGCGCCGCAA SNSitBKEcolrev gaattcCTATACGAGGTGTCCG	pGBKT7	intrazelluläre Bereich von Sns

### 2.2.13 Verwendete Konstrukte

#### Verwendete Klonierungsvektoren

Klonierungsvektoren	Beschreibung	Referenz
pCR®-II-Topo®	Vektor zur Klonierung von PCR Produkten mit TA-Überhang	Invitrogen, Karlsruhe
pEnter™/D-Topo®	Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten mit CACC-Überhang	Invitrogen, Karlsruhe

#### Verwendete Expressionsvektoren

Expressionsvektoren	Beschreibung	Referenz
pUAS <sub>t</sub> -attB-rfA-mcherry	Auf $\phi$ C31-vermittelter Integration basierender Transformationsvektor zur Expression von C-terminalen mcherry-Fusionsproteinen in <i>Drosophila</i> oder <i>Drosophila</i> Zellen. Insetierte Gene sind unter der Kontrolle von UAS-Elementen. Klonierung über Gateway®-System in rfA-Stelle.	Sven Bogdan, Philipps-Universität Marburg
pUAS <sub>p</sub> -attB-rfA-Myc	Beschreibung siehe pUAS <sub>t</sub> -attB-rfA-mcherry. C-terminales 10x Myc Fusionsprotein.	Sven Bogdan, Philipps-Universität Marburg

#### Verwendete Vektoren für das Hefe-2-Hybridsystem

Hefevektoren	Beschreibung	Referenz
pGBKT7	Leervektor für das Hefe-2-Hybridsystem mit DNA-Bindedomäne. Enthält die Gal4-Bindedomäne.	Matchmaker 2-Hybridsystem 3, Clontech
pGADT7	Leervektor für das Hefe-2-Hybridsystem mit DNA-Aktivierungsdomäne. Enthält die Gal4-Aktivierungsdomäne.	Matchmaker 2-Hybridsystem 3, Clontech
pGADT7-T	Kontrollvektor, der für ein virales T-Antigen kodiert. Enthält die Gal4-Aktivierungsdomäne.	Matchmaker 2-Hybridsystem 3, Clontech



pGBKT7-p53	Kontrollvektor, der das murine p53 Protein kodiert und zusammen mit pGADT7-T eine Positivkontrolle darstellt. Enthält die Gal4-Bindedomäne.	Matchmaker 2-Hybridsystem 3, Clontech
pGADT7-Lam	Kontrollvektor, der für humanes Laminin C, welches keine Komplexe mit anderen Proteinen bilden kann. Dient zusammen mit pGADT7-7 als Negativkontrolle. Enthält die Gal4-Aktivierungsdomäne.	Matchmaker 2-Hybridsystem 3, Clontech

### 2.2.14 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Alle mit BL gekennzeichneten Fliegenstämme stammen vom Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University, Bloomington, USA). Detaillierte Informationen über diese Fliegenstämme sind auf der Homepage [www.flystocks.bio.indiana.edu](http://www.flystocks.bio.indiana.edu) zu erfahren. Alle anderen Stämme stammen entweder aus der eigenen Stammhaltung oder wurden von anderen Laboren bezogen.

Fliegenlinie	Lokalisation	Beschreibung	Referenz
<i>white</i> (w 1118)	X Chr.	weiße Augenfarbe	Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl
<i>P(CaryP)attP40</i>	2. Chr.	zur ΦC31-vermittelten Integration von Gatewaykonstrukten	B125709
<i>M(3xP3-RFP attP)</i>	3. Chr.	zur ΦC31-vermittelten Integration von Gatewaykonstrukten	B124749
Balancerlinien und Marker			
<i>Dr/TM3, Sbe (Dr / TDIZ, Sb)</i>	3. Chr.	Drop (Dr) tropfenförmige Augen; TM3 Balancer Chromosom; TM3 (Dfd-lacZ lacZ) lacZ Expression im Maxillar-Segment; Stubble (Sb) verkürzte Thorakalborsten; ebony (e) dunkle Körperfärbung	
<i>Sp/CyOhglacZ; TM2, Dr/Sb, TDLZ</i>	2. Chr. und 3. Chr.	<i>sternopleura</i> (Sp) vermehrte Borsten auf der Sternopleuralplatte ; <i>CyO</i> (CyO) nach oben gebogene Flügel CyO; (hg-lacZ) lacZ Expression im Hinterdarm; TM2 Balancer Chromosom; Drop(Dr) tropfenförmige Augen; <i>Stubble</i> (Sb) verkürzte Thorakal borsten; TM3 P (Dfd-lacZ lacZ) lacZ Expression im Maxillar-Segment	Dr. A. Holz, Universität Gießen
<i>If/CyO hg lacZ</i>	2. Chr.	<i>inflated</i> (If) verschmälerte Augen und verschmolzene Ommatidien; CyO Marker	
<i>Sp/CyO; TM2, Ubx/MKRS, Sb (CSTM)</i>	2. Chr. und 3. Chr.	Sp vermehrte Borsten; CyO Flügelmarker, MKRS Balancer mit Sb, Marker für verkürzte Thorakalborsten, TM2 Balancer mit Ubx	

Gal4-Treiberlinien			
<i>Mef2</i> -Gal4	3. Chr.	Gal4 Expression im gesamten Mesoderm (Stadium 11-15)	(Ranganayakul u et al. 1996)
<i>twist</i> -Gal4	X Chr.	Expression von Gal4 im gesamten Mesoderm im <i>twi</i> Muster (Stadium 7-12)	(Baylies und Bate 1996)
<i>1151Gal4</i>	2. Chr.	Expression von Gal4 in larvalen adepthelialen Zellen, unter der Kontrolle des 1151 Promotors	(Blochliger et al. 1991)
<i>actin88Gal4</i>	3. Chr.	Expression von Gal4 in der indirekten Flugmuskulatur unter der Kontrolle des Actin 88F Promotors	B138461
UAS-Effektorstämme			
<i>UAS-shibire-K44A</i>	2. Chr. und 3. Chr.	Expression von ungetaggtten dominant-negativen <i>shibire</i>	
<i>UAS-rab4-fl-YFP</i>		Expression von C-terminalen YFP-getaggtten full-length <i>rab4</i>	B19767
<i>UAS-rab4-S22N-YFP</i>	2. Chr.	Expression von C-terminalen YFP-getaggtten dominant-negativen <i>rab4</i>	B19768
<i>UAS-rab4-Q67L-YFP</i>	3. Chr.	Expression von C-terminalen YFP-getaggtten constitutiv-aktiven <i>rab4</i>	B19770
<i>UAS-YFP-rab11-fl/TM3, Sb</i>	3. Chr.	Expression von C-terminalen YFP-getaggtten full-length <i>rab11</i> , balanciert über TM3 (Dfd-lacZ lacZ) Expression im Maxillar-Segment; Stubble (Sb) verkürzte Thorakalborsten;	B19790
<i>UAS-rab11-S25N-YFP</i>	2. Chr.	Expression von C-terminalen YFP-getaggtten dominant-negativen <i>rab11</i>	B19792
<i>UAS-rab11-Q70L-YFP</i>	3. Chr.	Expression von C-terminalen YFP-getaggtten constitutiv-aktiven <i>rab11</i>	B19791
<i>UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry</i>	2. Chr.	Deletion der GED-Domäne und Prolin-reichen Region, C-terminaler mCherry-Anhang	generiert von Carina Braukmann
<i>UAS-drp1-fl-mcherry</i>	2. Chr.	gesamter offener Leserahmen von <i>drp1</i> fusioniert mit C-terminalen mCherry	generiert von Carina Braukmann
<i>UAS-shark-fl-myc</i>	3. Chr.	gesamter offener Leserahmen von <i>drp1</i> fusioniert mit C-terminalen 10xMyc	generiert von Christina Hornbruch-Freitag
RNAi-Linien			
<i>drp1</i> -RNAi		<i>UAS-drp1</i> -RNAi	B127682
<i>shark</i> -RNAi	3. Chr.	<i>UAS-shark</i> -RNAi	B125788

Mutanten und Deletionsstämme			
<i>sns</i> <sup>20-15</sup> /CyO	2. Chr.	lethale Mutation in der intrazellulären Domäne von <i>sns</i>	Susan Abmayr
<i>blow</i> <sup>2</sup> /CyObb; Mef2-Gal4	2. Chr.	<i>blow</i> <sup>2</sup> Allel, Nullmutante auf Protein- und mRNA Level	
<i>milt</i> /CyO	2. Chr.	lethale P-Elementinsertion in <i>milt</i>	B110553
<i>marf</i> /TM6B, Tb	3. Chr.	lethale P-Elementinsertion in <i>marf</i>	B167157
<i>drp1</i> <sup>1</sup> /CyO, Gal4-Kr, UAS-GFP	2. Chr.	lethale Punktmutation in <i>drp1</i>	B124885
<i>drp1</i> <sup>2</sup> /CyO, Gal4-Kr, UAS-GFP	2. Chr.	lethale Punktmutation in <i>drp1</i>	B124899
<i>blow</i> <sup>1</sup> /CyOhglacZ	2. Chr.	Nullmutante für <i>blow</i>	B1107595
<i>shark</i> <sup>1</sup> /CyO	2. Chr.	lethale Punktmutation in <i>shark</i>	B15865
<i>duf</i> , <i>rst</i> /FM7c ftz lac Z	2. Chr.	Defizienz die <i>duf</i> und <i>rst</i> einschließt	B16018
<i>sing</i> <sup>22</sup> /FM7c ftz lac Z	X Chr.	EMS Mutante für <i>sing</i>	(Estrada et al. 2007)
<i>rols</i> <sup>117</sup> /TM3, Tb	3. Chr.	EMS Mutante für <i>rols</i>	(Putz et al. 2005)
<i>kette</i> <sup>14-48</sup> /TDLZ, Sb	2. Chr.	EMS Mutante für <i>kette</i>	
In dieser Arbeit generierte Fliegenstämme			
UAS- <i>drp1</i> -eGFP	2. Chr. und 3. Chr.	Expression von C-terminalen eGFP-getaggten full-length <i>drp1</i>	Transgen
UAS- <i>drp1</i> -Myc	2. Chr. und 3. Chr.	Expression von C-terminalen 10x Myc-getaggten full-length <i>drp1</i>	Transgen
UAS- <i>drp1</i> Δ GTPase-mcherry	2. Chr.	Deletion der GTPase-Domäne, C-terminaler mCherry Tag	Transgen
UAS- <i>drp1</i> Δ GED-mcherry	2. Chr.	Deletion der GED-Domäne, C-terminaler mCherry Tag	Transgen
UAS- <i>drp1</i> -T637D-mcherry	2. Chr.	Aminosäureaustausch an der Position T637D, C-terminaler mCherry Tag	Transgen
UAS- <i>drp1</i> Δ GTPase-myc	2. Chr.	Deletion der GTPase-Domäne, C-terminaler 10x Myc Tag	Transgen
UAS- <i>drp1</i> Δ GED-myc	2. Chr.	Deletion der GED-Domäne, C-terminaler 10x Myc Tag	Transgen
UAS-shark Δ kin-mcherry	2. Chr.	Deletion der Kinase-Domäne, C-terminaler mCherry Tag	Transgen
UAS-shark Δ 2SH2-mcherry	2. Chr.	Deletion beider SH2-Domänen, C-terminaler mCherry Tag	Transgen
UAS-shark Δ Ank-myc	2. Chr.	Deletion der vier Ank-Repeats, C-terminaler 10x Myc Tag	Transgen

<i>blow</i> <sup>2</sup> , <i>drp1</i> <sup>1</sup> /CyO, bb	2.Chr.	Rekombinante für <i>blow2</i> und <i>drp11</i>	Doppelmutante
<i>shark</i> <sup>1</sup> , <i>sns</i> <sup>20-15</sup> /CyO, bb	2.Chr.	Rekombinante für <i>shark1</i> und <i>sns20-15</i>	Doppelmutante

## 2.3 Arbeiten mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

### 2.3.1 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

Die Stammhaltung von *Drosophila* erfolgt in Klimakammern mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% bei 18°C oder 25°C auf mit Maismehlagar gefüllten Flaschen. Die Generationszeit beträgt bei 25°C etwa 10 Tage und bei 18°C etwa 18 Tage. Die Fliegen werden alle zwei bis drei Wochen umgesetzt.

### 2.3.2 *Drosophila* Kreuzungen

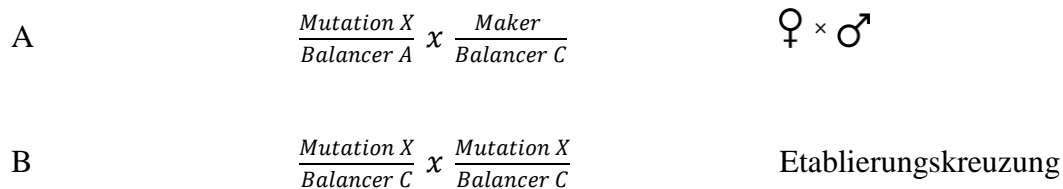
Es werden für Kreuzungen nur jungfräuliche Weibchen eingesetzt. Dafür werden morgens die Elterntiere von der Flasche abgeklopft und im Laufe des Tages die geschlüpften Tiere abgesammelt. Dabei sollten die Jungfrauen nicht älter als drei bis fünf Stunden sein (auf 24°C). Die frisch geschlüpften Fliegen sind an ihrer hellen Körperfarbe und dem durchscheinenden Darm zu erkennen. Die Fliegen werden zum Sortieren mit CO<sub>2</sub> betäubt. Für Kreuzungen werden drei Weibchen und zwei Männchen zusammengesetzt, für Kreuzungen auf Ablagen sind es etwa 20 Weibchen und etwa 10 Männchen.

#### 2.3.2.A Balancerlinien und Mehrfachmarkierung von Chromosomen

Nach Lindsley und Zimm (1992)

Oft sind Mutationen homozygot letal, weswegen sie über sogenannten Balancerchromosomen gehalten werden, welche sich durch einen sehr spezifischen Aufbau auszeichnen. Um eine homologe Rekombination zu vermeiden tragen sie parazentrische Inversionen. Zudem sind diese homozygot letal, wodurch sichergestellt wird, dass die Mutation immer heterozygot über dem Balancer vorliegt. Adulte Tiere sind anhand von dominanten Markern auf den Balancerchromosomen von nicht balancierten Tieren zu unterscheiden. Einige Balancerchromosome tragen zudem Reporterplasmide, was eine Unterscheidung zwischen

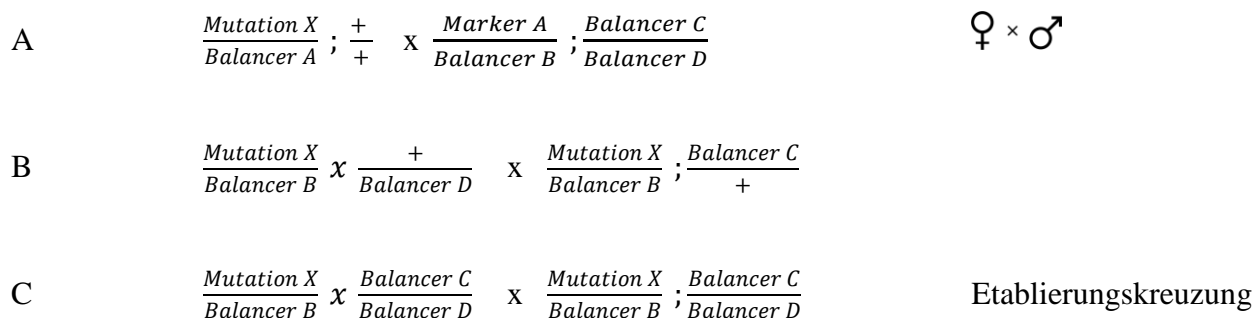
homozygoten und heterozygoten Embryonen möglich macht. Ein Austausch zwischen verschiedenen Markern- und Balancerchromosomen ist möglich und wird Umbalancieren genannt. Dazu wird der Ausgangsstamm mit einem Stamm gekreuzt, welcher den gewünschten Balancer mit Marker trägt. In der F1-Generation werden dann die Fliegen weiter gekreuzt, welche die Mutation über dem gewünschten Balancer mit Marker tragen (Abb.9).



**Abb. 9: Schema einer Umbalancierung.** (A) Zunächst wird eine Ausgangslinie mit einer Fliegenlinie, welche die gewünschten Balancer trägt verkreuzt. (B) Anschließend erfolgt die Etablierungskreuzung, in der Fliegen miteinander verpaart werden, die sowohl die Mutation als auch den neu einzubringenden Balancer tragen.

### 2.3.3 Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie

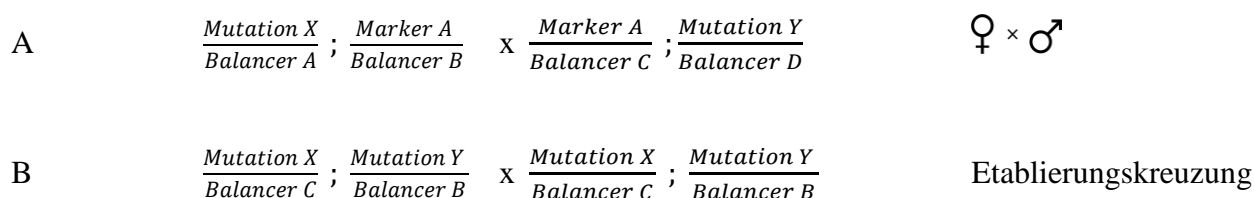
Mehrfachmarkierungen von Chromosomen sind die Voraussetzung dafür Doppelmutanten erzeugen zu können, welche auf verschiedenen Chromosomen unterschiedliche Mutationen tragen. Dafür wird der Ausgangsstamm mit einem Balancerstamm gekreuzt, welcher für die gewünschten Chromosomen je Allel einen Balancer mit unterscheidbaren Markern trägt (Abb. 10). In der F1-Generation werden Fliegen, welche die Mutation über den gleichen Balancer und für das andere Chromosom jeweils unterschiedlichen Balancer über dem Wildtyp Allel tragen miteinander gekreuzt. In der F2-Generation werden dann Fliegen miteinander gekreuzt, die sowohl die Mutation über dem gleichen Balancer als auch jeweils beide Balancer für das andere Chromosom tragen. Damit ist die Linie in der nächsten Generation etabliert.



**Abb. 10: Schema einer Mehrfachmarkierung.** (A) Die Ausgangslinie wird im ersten Schritt mit einer Balancerlinie für beide Chromosomen gekreuzt. (B) In der Folgegeneration werden jungfräuliche Weibchen mit Männchen verpaart, welche beide den gleichen Genotyp für das Chromosom, auf dem die Mutation liegt, haben. (C) Auf dem anderen Chromosom wird auf verschiedene Balancer selektiert, damit für die Etablierungskreuzung Fliegen eingesetzt werden können, welche alle Balancer tragen.

### 2.3.3.A Erzeugung einer Doppelmutante

Genetische Interaktionsstudien erlauben eine Aussage darüber, ob Gene in derselben Signalkaskade wirken. Hierfür werden verschiedene Mutationen in einem Fliegenstamm zusammengeführt. Der Phänotyp der Einzelmutante wird dann in Bezug zum Phänotyp der Doppelmutante gesetzt. Wenn die zu kombinierenden Gene auf verschiedenen Chromosomen liegen werden zunächst beide Ausgangsstämme für das jeweils andere Chromosom für beide Allele markiert und anschließend die so markierten Linien miteinander gekreuzt und danach etabliert, sodass nun beide Mutationen stabil über einen Balancer liegen (Abb. 11).



**Abb. 11: Schema für die Etablierung einer Doppelmutante.** (A) Zunächst werden Jungfrauen der einen Mutante mit Männchen der zweiten Mutante verkreuzt. (B) Anschließend erfolgt die Etablierungskreuzung, bei der Männchen und Weibchen mit jeweils beiden Mutationen sowie gleichen Balancerkombination verkreuzt werden.

### 2.3.3.B Erzeugung von Rekombinanten

Liegen zwei zu untersuchende Mutationen auf dem gleichen Chromosom, muss eine sogenannte Rekombinante generiert werden, um beide Mutationen auf einem Allel zu vereinigen. Zunächst müssen beide Mutationen in einem transheterozygoten Zustand in einer Linie vereint werden (Abb. 12). Die eigentliche Rekombination findet durch ein Crossover der Chromosomen in den Gameten in der F1-Generation statt. Der synaptonemale Komplex in *Drosophila* wird nur in Weibchen ausgebildet, weshalb für die Kreuzung der F1-Generation jeweils ein transheterozygotes Weibchen gegen Balancer-Tiere gekreuzt werden. Die Nachkommen werden erneut in Einzelpaarkreuzungen gegen Balancer-Männchen gekreuzt, um unabhängige Linien zu etablieren. Die Anzahl der anzusetzenden Kreuzungen richtet sich dabei nach dem Abstand in Centi-Morgan zwischen den beiden Mutationen. Dabei entspricht ein Centi-Morgan einer Rekombinations-Wahrscheinlichkeit von 1%. Durch Letalitätskreuzungen wird das Vorhandensein beider Mutationen überprüft.

A	$\frac{\text{Mutation X}}{\text{Balancer}} \times \frac{\text{Mutation Y}}{\text{Balancer}}$	♀ × ♂
B	$\frac{\text{Mutation X}}{\text{Mutation Y}} \times \frac{\text{Marker}}{\text{Balancer}}$	♀ × ♂
C	$\frac{\text{Mutation X, Mutation Y}}{\text{Balancer}} \times \frac{\text{Marker}}{\text{Balancer}}$	♂ × ♀
D	$\frac{\text{Mutation X, Mutation Y}}{\text{Balancer}} \times \frac{\text{Mutation X, Mutation Y}}{\text{Balancer}}$	Etablierungskreuzung

**Abb. 12: Kreuzungsschema für die Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie.** (A) Zunächst werden beide Ausgangslinien mit verschiedenen Mutationen miteinander verkreuzt. (B) In der nächsten Generation werden Jungfrauen ohne Balancer und Marker mit einem Männchen des Balancerstammes verpaart. (C) In der Folgegeneration wird ein Männchen mit einer Jungfrau des Balancerstammes verkreuzt. (D) Für die Etablierungskreuzung werden Männchen und Jungfrauen, welche jeweils beide Balancer tragen verkreuzt.

### 2.3.4 P-Element Keimbahntransformation durch Mikroinjektion

#### 2.3.4.A Prinzip einer Mikroinjektion

(Bischof et al. 2007)

Bei einer Mikroinjektion in *Drosophila* Embryonen wird DNA in den posterioren Bereich von Embryonen im Stadium des syncytialen Blastoderms eingebracht, da hier die Zellkerne noch ohne Zellmembran vorliegen. Aus diesem Bereich entstehen die Polzellen, welche später die Anlagen der Gonaden bilden. Die einzubringende DNA liegt in einem P-Element basierten Expressionsvektor vor und kann so stabil in das Genom von *Drosophila* integriert werden. Ein P-Element ist ein doppelsträngiges DNA basiertes Transposon, welches an beiden Enden gegenläufige Wiederholungssequenzen besitzt. Es enthält das Gen für die Transposase und ein modifizierte Variante des Wildtyp-Allels des Genes *white*, welches als Marker für die Augenfarbe fungiert. Über den Augenmarker kann man das Vorhandensein des P-Elementes und somit der eingebrachten DNA in adulten Tieren in einem *white* negativen Hintergrund nachvollziehen. Als Expressionsvektor wird der pUAST Expressionsvektor verwendet und um eine präzise Integration auf ein bestimmtes Chromosom zu erlauben, wird das  $\Phi$ C31-basierte Integrationssystem genutzt. Die Fliegenstämme tragen an kartierten Stellen definierte *attP*-Sequenzen, wodurch das eingebrachte DNA-Konstrukt an genau festgelegte Orte im Genom integriert.

#### 2.3.4.B Mikroinjektion in *Drosophila* Embryonen

Für die Mikroinjektion werden 5  $\mu$ g der aufgereinigten DNA mit 2,5  $\mu$ l 10x Injektionspuffer versetzt. Anschließend wird mit ddH<sub>2</sub>O auf 25  $\mu$ l aufgefüllt. Etwaige Schwebeteilchen werden für mindestens 30 min bei 13000rpm abzentrifugiert, um einem Verstopfen der Injektionsnadel entgegen zu wirken. Währenddessen werden Embryonen von den 20minütig erneuerten Apfelsaftablagen abgesammelt, gewaschen und mit 1:1 Klorix ddH<sub>2</sub>O dechorionisiert. Anschließend werden die Embryonen auf ein mit Heptankleber beschichtetes Deckglas, mit dem posterioren Teil zum Rand zeigend, aufgereiht. Diese werden für 10 min getrocknet und anschließend mit Voltalef-Öl überschichtet. Die DNA Injektion erfolgt nun in den Bereich der sich bildenden Polzellen. Nach der Injektion werden die Deckgläser mit den Embryonen in eine



mit Apfelsaftagar gefüllte Petrischale überführt. Die Petrischalen werden bei 25°C bis zum Schlüpfen der Larven inkubiert.

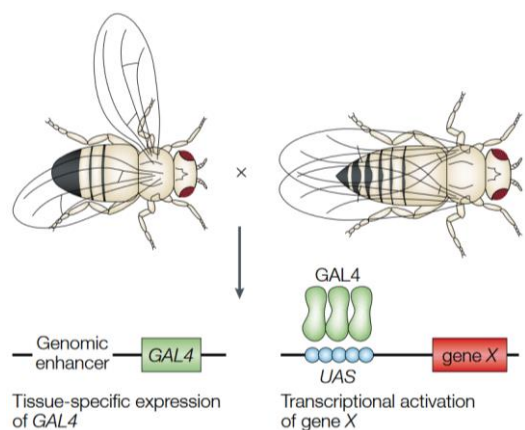
### 2.3.5 Etablierung transgener Fliegenstämme

Nach 24 stündiger Inkubation werden die frisch geschlüpften Larven von dem Apfelsaftagar abgesammelt und in Maismehlagar-Röhrchen überführt und bis zum adulten Stadium hochgezogen. Alle adulten Fliegen werden zunächst gegen den *w<sup>-</sup>*-Stamm gekreuzt. Erst in der nächsten Generation ist sichtbar, ob die Integration der eingebrachten DNA erfolgreich war, da die Integration in der Keimbahn erfolgt. Es werden Nachkommen abgesammelt, welche eine gelblich bis rötliche Augenfärbung aufweisen und mit ebenfalls rotäugigen Nachkommen gekreuzt, um eine homozygote transgene Linie zu etablieren.

#### 2.3.5.A Eine ektopische Expression von Genen mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems

(Brand und Perimon 1993)

Eine gezielte Proteinexpression Zelltyp oder Gewebe-spezifisch ist mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems möglich. Gal4 ist ein Protein, welches in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als Transkriptionsregulator dient. Es bindet an eine UAS-Sequenz (Upstream Activating Sequence), welches analog zu dem Enhancer-Element in multizellulären Eukaryoten ist. Dies führt zu einer Transkriptionsaktivierung des nachfolgenden Zielgenes. Dieses System kann auch in *Drosophila* genutzt werden, um Gene ektopisch zu exprimieren. Dafür werden die UAS-Sequenz mit dem nachfolgenden Zielgen und das *gal4*-Gen in einer weiteren transgenen Linie verkreuzt. Die Gal4-Linie liefert zwar das Aktivator-Protein, aber nicht das zu aktivierende Zielgen. In der UAS-Linie bleibt das Zielgen dagegen untranskribiert, da der Aktivator fehlt. Kreuzt man beide Linien zusammen, sodass sowohl die UAS-Sequenz als auch das *gal4*-Gen vorhanden ist, kommt es zu einer ektopischen Expression des UAS-Zielgenes im gewünschten Zelltyp oder Gewebe (Abb. 13). Wichtig dabei ist, dass der Aktivator dabei keine endogenen Bindestellen aufweist um eine unerwünschte Expression anderer Gene zu vermeiden.



**Abb. 13: Schematische Darstellung des UAS-Gal4 Systems.**

Damit es zur Expression des Zielgens kommt werden zwei Fliegen miteinander verkreuzt. Eine trägt Gal4 unter Kontrolle eines spezifischen Promotors, die andere eine UAS-Bindestelle vor dem zu exprimierenden Zielgen. In der nächsten Generation kann das neu gebildete Gal4-Protein an die UAS-Aktivierungsdomäne binden und somit die Expression des Zielgens initiieren (modifiziert nach St Johnston 2002).

### 2.3.6 Sammeln von *Drosophila* Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen werden adulte Fliegen auf Traubensaft- oder Apfelsaftflaschen gesetzt und bei 25°C zum Ablegen gebracht. Zweimal täglich wird die Ablage gewechselt und bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums bei 18°C gelagert. Anschließend werden diese bei 4°C gelagert. Nach drei Tagen erfolgt die Fixierung.

### 2.3.7 Formaldehyd-Fixierung von *Drosophila* Embryonen

Die Embryonen auf den Ablagen werden mit einem Pinsel und H<sub>2</sub>O in Netzchen überführt. Um das Chorion abzulösen werden die Embryonen 5 min in einem Gemisch aus Klorix:H<sub>2</sub>O (1:1) geschwenkt. Die glänzende Vittellinschicht sollte zu sehen sein. Anschließend werden die Embryonen für 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen, auf einem Zelltuch trocken getupft und in Heptan überführt. Von dort werden sie mit Heptan in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das Heptan wird abgenommen, jeweils 500µl 4 % Formaldehyd in PBS (F-PBS) und 500µl Heptan zu den Embryonen gegeben und für 20 min unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend wird zuerst die untere wässrige Phase entfernt und dann die organische Phase. Die Vitellinschicht wird durch vortexen der Embryonen in 500µl Heptan und 500µl Methanol abgelöst. Beide Phasen werden nun erneut abgenommen ebenso wie alle Embryonen die nicht absinken. Die Embryonen werden zweimal mit Methanol gewaschen und anschließend bei 4°C gelagert.

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Fluoreszenzantikörperfärbung an *Drosophila* Embryonen

Nach Lawrence und Johnston (1989)

Von zuvor fixierten Embryonen wird das Methanol abgenommen und diese dreimal 10 min in 1x PBT gewaschen. Anschließend wird der Primärantikörper in PBT verdünnt und 500µl davon auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper abgenommen und die Embryonen dreimal 10 min mit 1x PBT gewaschen. Um unspezifische Bindestellen abzudecken erfolgt eine 30 minütige Inkubation mit 2% Ziegen Serum/PBT. Der Überstand wird abgenommen und der passende sekundäre Antikörper in entsprechender Verdünnung in 500µl 1x PBT auf die Embryonen gegeben und diese für zwei Stunden im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach zwei Stunden wird der zweite Antikörper abgenommen und die Embryonen dreimal 10 min in 1x PBT gewaschen. Dabei wird möglichst abgedunkelt gearbeitet, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Die Embryonen werden nun in Fluoromount-G<sup>TM</sup> eingebettet (2.3.3).

### 2.4.2 *whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen

Nach Tautz und Pfeifle (1989)

Die Expression von mRNA im embryonalen Gewebe kann spezifisch durch Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonde nachgewiesen werden. Das DIG wird anschließend mit Hilfe eines Antikörpers, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen.

### 2.4.3 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde mittels *in vitro* Transkription

Um einzelsträngige DIG markierte RNA-Sonden herzustellen, wird linearisierte Plasmid-DNA und eine entsprechenden RNA-Polymerase verwendet. Die Plasmid-DNA wird zunächst durch Restriktionsendonukleasen stromabwärts der zu transkribierenden DNA linearisiert. Dafür werden 3µg Plasmid-DNA, 0,4µl Enzym sowie 5µl 10x Restriktionspuffer in einem Gesamtansatz von 50µl verwendet, bei 37°C inkubiert und anschließend durch eine Ethanolpräzipitation aufgereinigt. Die DNA wird in 14µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und komplett zur

*in vitro* Transkription verwendet. Dafür werden 2µl 10x DIG-RNA-Labeling Mix, 2µl RNA-Polymerase (T7-, T3- oder Sp6-Polymerase) sowie 2µl 10x Transkriptionspuffer zugegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die so synthetisierten sense- (5'→3') und antisense- (3'→5') Sonden werden mittels Ethanolpräzipitation gefällt und in 20µl eines 1:1 Gemisches aus ddH<sub>2</sub>O und Hybridisierungslösung aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

#### 2.4.4 Qualitätstest der DIG-markierten RNA-Sonden

Die Qualität und die geeignete Verdünnung für die *in situ* Hybridisierung werden mit einem sogenannten „Dot Blot“ festgestellt. Es werden hierfür die Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:1000 der hergestellten Sonden auf eine „Hybond-N-Membran“ getropft und diese nach dem Verdunsten der Flüssigkeit mit einem UV-Crosslinker fixiert. Die Membran anschließend für 10min in 1x PBT gewaschen und in einem α DIG-AP-Antikörper (1:5000) in 1x PBT für eine Stunde bei RT unter leichten Schwenken inkubiert. Die Membran wird dann für 5 min in 1x PBT gewaschen und für 10 min in NBT-Puffer inkubiert. Die Färbung erfolgt durch die Zugabe von 4µl NBT und 3,5µl BCIP (X-Phosphat) in 2ml NBT-Puffer, welche auf die Membran gegeben wird. Die Membran wird solange inkubiert bis die gewünschte Farbintensität erreicht wird. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe von 1x PBT abgestoppt. Der Farbintensität der einzelnen Verdünnungen kann entnommen werden, welche Verdünnung für die *in situ* Hybridisierung geeignet ist.

#### 2.4.5 *in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen

Die zuvor fixierten Embryonen werden dreimal 10min in 1x PBT rehydriert und das Wasserbad auf 80°C hochgeheizt. Die Embryonen werden mit einer 1:1 Lösung Hybridisierungslösung/1x PBT für 15 min umgepuffert und anschließend 5x 10min in Hybridisierungslösung gewaschen. Im Wasserbad wird die Hybridisierungslösung kurz aufgekocht und anschließend wieder abgekühlt und jeweils 100µl auf die Embryonen gegeben. Diese werden bei 57°C in einem Heizblock für 1 Stunde prähybridisiert. Währenddessen wird die RNA-Sonde entsprechend dem Qualitätstest verdünnt und für 15min bei 80°C denaturiert. Der Überstand wird von den Embryonen abgenommen und durch die verdünnte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt bei

57°C über Nacht. Am folgenden Tag wird die Sonde abgenommen und die Embryonen in vorgewärmter Hybridisierungslösung (60°C) 5min bei 57°C gespült und anschließend für weitere 15 min in Hybridisierungslösung inkubiert. Die weiteren Waschschrte erfolgen bei 57°C. Die Embryonen werden für 15min mit frischer Hybridisierungslösung inkubiert. Dann erfolgt eine Umpufferung in vorgewärmte Hybridisierungslösung/PBT (1:1) für 15min. Die Embryonen werden anschließend 5 mal 5min in PBT gewaschen. Die Embryonen werden für 2 Stunden im anti-DIG Antikörper (1:2000) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgen 5 Waschschrte in 1x PBT für 10min, sowie 3 mal 10min in NBT-Puffer mit 0,1% Tween. Die Embryonen werden mit frischem NBT-Puffer in ein Blockschälchen überführt und die Farbreaktion durch die Zugabe von 4µl NBT-Substrat und 4µl X-Phosphat gestartet. Die Reaktion findet im Dunkeln statt und wird bei ausreichender Färbung durch mehrmaliges Waschen mit 1x PBT gestoppt. Anschließend werden die Embryonen entwässert und in Epon eingebettet (siehe 1.4.6.B).

#### **2.4.6 Herstellung von Dauerpräparaten**

##### **2.4.6.A Herstellung von Dauerpräparaten mit Fluoromount-G™**

Nach dem Waschen wird das PBT möglichst vollständig von den Embryonen abgenommen und je nach Anzahl der Embryonen eine entsprechende Menge Fluoromount-G™ auf diese gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Dann werden die Embryonen auf einen Objektträger transferiert und mit einem Deckglas eingedeckelt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

##### **2.4.6.B Einbettung in Epon**

Die Embryonen werden zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Zuerst 1x 10 min in 70% EtOH, anschließend 3x 10 min in 96% EtOH sowie über Nacht in 96% EtOH. Auf einem Objektträger wird eine dünne Schicht Epon möglichst luftblasenfrei verteilt. Die Embryonen werden dann mit möglichst wenig Ethanol auf das Epon getropft und anschließend gleichmäßig verteilt. Dann kann das Deckglas aufgebracht werden und das Präparat wird für 48 Stunden bei 60° ausgehärtet werden. Die Aufbewahrung ist bei RT möglich.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Primer Design

PCR Primer sollten für die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Die Länge sollte zwischen 15 bis 25 Nukleotiden liegen, wobei der CG-Gehalt bei 50 bis 60% liegen sollte. Der Anfang und das Ende der Sequenz sollten nicht mit komplementären Basen abschließen (AT oder CG), um Sekundärstrukturen des Primers zu verhindern. Die spezifische Annealingtemperatur des Primers kann über folgende Formel abgeschätzt werden:

$$(\text{Anzahl C und G} \times 4) + (\text{Anzahl A und T} \times 2) = T_M \text{ (Schmelztemperatur)}$$

Die Annealingtemperatur sollte dabei bei ca. 60°C liegen. Außerdem sollte die Schmelztemperatur eines Primerpaares in etwa gleich sein. Für Klonierungen ist es außerdem möglich Restriktionsschnittstellen einzufügen.

### 2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Nach Mullis et al. (1986) und Saiki et al. (1988)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Dabei werden Primer, genauer deren freie 3'-OH-Enden, als Startstellen der Reaktion genutzt, welche eine Amplifikation eines definierten DNA-Bereiches ermöglicht. Die Primer sind dabei komplementär zur den flankierenden Bereichen des Zielfragments. Zur exponentiellen Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments werden Denaturierung-, Annealing- und Elongationsschritte zyklisch wiederholt. Die verwendete Accu-Prime Taq Polymerase besitzt dabei 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche zusätzlich eine *Proofreading* Funktion besitzt. Dadurch wird die Genauigkeit der Amplifikation stark erhöht.

Der PCR-Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

Template DNA	10-25ng
forward Primer	20pmol
reverse Primer	20pmol
10x Reaktionspuffer	1/10 des Ansatzes
dNTP Mix	10mM
MgCl	1-2,5µl je nach Polymerase

DNA-Polymerase	1U
H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Der Ansatz wird in einen Thermocycler gegeben und die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	40 sec
3. Annealing	variabel	40-60 sec
4. Elongation	68°C bzw 72°C	1 min pro kb PCR-Produkt
5. Elongation	68°C bzw 72°C	10 min

Bei der Denaturierung handelt es sich um eine Aufschmelzung der DNA-Stränge, damit die Primer binden können. Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Annealingtemperatur des Primers und stellt die Temperatur dar, bei der sich die Primer (möglichst spezifisch) an das DNA-Template anlagern können. Die Temperatur ist für jedes Primerpaar anders und muss ausgetestet werden. Die Elongationszeit hängt von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab. Pro Minute kann 1kb amplifiziert werden. Für die Reaktion werden die Schritte 2 bis 4 30 mal wiederholt.

### 2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Nach Sambrook et al. (1989)

Über eine Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach Größe und Struktur aufgetrennt werden. Die DNA-Fragmente werden über Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches dem Gel zugesetzt wird und in die DNA interkaliert. Ethidiumbromid kann mit UV-Licht angeregt und die DNA unter einem UV-Illuminator sichtbar gemacht werden. Die DNA weist aufgrund ihrer Phosphatreste eine negative Ladung auf und kann somit in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Für die Gelelektrophorese wird ein 1%iges Agarosegel verwendet, welches mit 1xTBE überschichtet wird. Die Proben werden mit Ladepuffer versetzt und 1,5µl eines Größenstandards aufgetragen. Anschließend wird eine Spannung von 100-120 Volt angelegt. Nachdem die Proben bis zur Hälfte des Gels gelaufen sind wird das Gel unter UV-Licht fotografiert oder für die weitere Verwendung präpariert.

#### 2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach dem Handbuch des NucleoSpin® Kits

(NucleoSpin® Extraktion Kit, Macherey-Nagel, nach Angaben des Herstellers)

Das Agarosegel wird unter einen UV-Illuminator gelegt und die gewünschte Bande mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Gelstück werden 300µl NTI Puffer gegeben und das Gelstück bei 50°C für 15 min gelöst. Nachdem das Gelstück vollständig gelöst ist wird die Lösung auf eine Säule gegeben und diese für 30sec bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Säule zweimal mit 700µl NT3 gewaschen. Damit die DNA von der Säule eluiert werden kann wird die Säule für 30sec bei 13000rpm trocken zentrifugiert. Die Eluation erfolgt mit 20µl Eluationspuffer für 5-15min bei Raumtemperatur, anschließend wird die Säule erneut bei 13000rpm zentrifugiert und die DNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.5.5 Aufreinigung von DNA zum Injizieren von Drosophila Embryonen

(NucleoSpin® Extraktion Kit, Macherey-Nagel, nach Angaben des Herstellers)

Zur Aufreinigung der DNA werden 10µl DNA mit 100µl NTI Puffer gemischt, der Ansatz auf eine Säule gegeben und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Säule für 30sec bei 13000rpm zentrifugiert. Die Säule wird zweimal mit 700µl NT3 Puffer gewaschen. Zum Lösen der DNA von der Säule wird diese für 30sec bei 13000rpm trocken zentrifugiert. Die Eluation erfolgt mit 20µl ddH<sub>2</sub>O für 5-15min bei Raumtemperatur. Die Säule wird erneut bei 13000rpm zentrifugiert und die DNA in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.5.6 Aufreinigung von DNA über Ethanol-Präzipitation

Über eine Ethanol-Präzipitation kann DNA, welche sich in Lösung befindet, aufgereinigt und konzentriert werden. Dem DNA-Ansatz werden 1/10 des Volumens 3M NaAc und 2,5fach des Gesamtvolumens 96% EtOH zugegeben und der Ansatz bei 13000rpm für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Dabei wird die DNA pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei 13000rpm 10 min bei 4°C in 70% EtOH gewaschen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und in 20µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.



### 2.5.7 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer

Um den DNA-Gehalt von Proben zu bestimmen, wird die OD bei einer Wellenlänge von 260nm mit Hilfe eines NanoDrop 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific, Waltman, MA) gemessen. Als Referenzwert wird dabei 1µl der Lösung verwendet in welcher die DNA gelöst wurde. Anschließend wird 1µl der DNA-Probe gemessen.

### 2.5.8 Klonierung von PCR-Produkten in Topo-Vektoren

(TOPO Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen, nach Angaben des Herstellers)

TOPO-Vektoren dienen als Zwischenvektoren und erleichtern die weiteren Umklonierungsschritte in andere Vektoren. Der linearisierte TOPO-Vektor besitzt am 3'-Ende kovalent über ein Tyrosinrest die Topoisomerase gebunden. Ein Angriff des 5'-Endes durch das PCR-Produkt führt zur Bildung einer neuen Phosphodiesterbrücke zwischen PCR-Produkt und Vektor und so zur Freisetzung der Topoisomerase, welche jetzt in der Lage ist das PCR-Produkt in den Vektor zu integrieren. Für die Wahl des passenden TOPO-Vektors ist wichtig mit welcher Polymerase die PCR durchgeführt wurde. Die Accu-Prime Taq Polymerase generiert über ihre terminale Transferase Aktivität am 3'-Ende der DNA-Fragmente einen Desoxyadenosin (A)-Überhang. Diese PCR-Produkte können in den linearisierten pCR<sup>®</sup>II-TOPO Vektor, welcher einen passenden Desoxythymidin (T)-Überhang besitzt, ligiert werden. Um das Gatewaysystem nutzen zu können werden PCR-Produkte in den pENTER<sup>™</sup>-Topo<sup>®</sup> Vektor kloniert. Dafür müssen die PCR-Produkte einen 5'CACC Überhang aufweisen. Dieser wird über den forward Primer eingebracht. Für die Reaktion wird folgender Ansatz verwendet, wobei jeweils nur einer der Vektoren verwendet wird:

0,5- 3µl	PCR Produkt
1µl	Salzlösung
0,2µl	pCR <sup>®</sup> II-TOPO Vektor
0,5µl	pENTER <sup>™</sup> -Topo <sup>®</sup> Vektor
ad 6µl	H <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wird 5-15min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

### 2.5.9 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 Ligase

Über die Ligation kann ein zuvor generiertes DNA-Produkt in einen zuvor linearisierten Vektor eingebracht werden. Dafür müssen sowohl das DNA-Produkt als auch der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Entscheidend ist das Mengenverhältnis von Vektor und DNA-Produkt:

$$\frac{(\text{Insertgröße in kb} \times \text{Vektormenge in ng})}{\text{Vektorgröße in kb}} = \text{einzusetzende Menge des Inserts in ng}$$

Für den Ligationsansatz werden 1/10 des Volumens 10x T4-Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtansatz von 20µl gegeben. Die Ligation erfolgt für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht im Kryobad. Anschließend können 3µl des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert werden.

### 2.5.10 Gateway Klonierung

(Akbari et al. 2009; Walhout et al. 2000); Gateway® Technologie, Invitrogen, nach Angaben des Herstellers)

Die Gateway® Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, welche eine effiziente Klonierung über sequenzspezifische Rekombination ermöglicht. Dabei wird die Eigenschaft der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda 1 genutzt, um schnell und sehr effizient DNA-Fragmente in Zielvektoren zu transferieren. Die Rekombination findet zwischen den attR und attL Stellen statt. Das gewünschte Insert wird mit einem 5'-CACC Überhang in den pENTR™/TOPQ® Vektor kloniert. Der Vektor ist so konzipiert, dass das Insert von attL1 und attL2 Sequenzen flankiert wird. Der Zielvektor trägt ein für *E. coli* toxisches ccdB Gen. Dabei katalysiert der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix die in vitro Rekombination eines attL1-Gen-attL2 Eingangsklon und eines attR1-ccdB-attR2 Zielvektors. Außerdem beinhaltet er alle für die Reaktion benötigten Komponenten und gewährt die nötigen Bedingungen.

Für die Reaktion werden 50 bis 150ng des Ausgangsklones (pENTER/D-TOPO-Klon) und 150ng des Zielvektors in einem Gesamtvolumen von 4µl in ein Reaktionsgefäß gegeben und 1µl des auf Eis aufgetauten Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix zu dem Ansatz gegeben und kurz gevortext. Der Ansatz wird für eine Stunde bei 25°C inkubiert und anschließend wird der Clonase Mix durch die Zugabe von 0,5µl Proteinase K (20mg/ml) für 10 min bei 37°C inaktiviert. 1µl des Reaktionsansatzes wird in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die

unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen des Eingangsvektors pENTR™/TOPQ® (Kan) und Zielvektors (Amp) sowie das für *E. coli* Zellen toxische ccdB-Genprodukt ermöglichen eine gezielte Selektion des rekombinierten Zielvektors.

#### 2.5.11 Herstellung chemisch kompetenter DH5a Zellen

Nach Sambrook et al. (1989)

Damit *E. coli* in der Lage ist DNA aufzunehmen, müssen sie entweder elektrisch oder chemisch kompetent gemacht werden. Um sie chemisch kompetent zu machen impft man 50ml LB Medium mit einer frischen *E. coli* Kolonie an und inkubiert diese bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen werden 300ml frisches LB Medium mit der Übernachtskultur 1:100 verdünnt und bei 37°C so lange inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht ist. Der Kolben wird für 60min auf Eis herunter gekühlt, auf 50ml Röhrchen aufgeteilt und anschließend bei 4000rpm 5min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 17ml eisgekühltem RF1 Puffer gelöst und 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut bei 4000rpm 5 min abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen und mit 4ml RF2 Puffer für 15 min auf Eis inkubiert. Dann werden die kompetenten Zellen zu 100 bis 150µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und diese sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

#### 2.5.12 DNA-Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Nach Sambrook et al. (1989)

Um Plasmid-DNA zu vervielfältigen wird diese in *E. coli* eingebracht. Dafür werden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 0,5-3µl der zu transformierenden Plasmid-DNA dazu gegeben und sachte gemischt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2:30min bei 37°C im Wasserbad. Dabei wird die Plasmid-DNA in die *E. coli* Zellen aufgenommen. Der Ansatz wird danach kurz auf Eis herunter gekühlt und 250µl LB Medium zu dem Ansatz hinzu gegeben und für 45min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wird auf LB Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.5.13 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### Plasmid-Isolation im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

Nach Birnboim und Doly (1979)

Eine 3ml Übernachtskultur wird in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4000rpm für 5min herunterzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 250µl E1 Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren wird zu dem Ansatz 250µl S2 Puffer gegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Der Ansatz wird mit 250µl S3 Puffer neutralisiert, gemischt und die Zelltrümmer bei 13000rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumenprozent Isopropanol versetzt. Die DNA wird bei 13000rpm 20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500µl 70% EtOH gewaschen. Die DNA wird erneut pelletiert und anschließend getrocknet. Das Pellet wird in 50µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 20 min bei 37°C im Wasserbad gelöst.

### 2.5.14 Plasmid-Isolation im präparativen Maßstab (Midi-Präparation)

(Genomed Jetstar, nach Angaben des Herstellers)

Um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten wird eine 50ml Übernachtskultur für die Midi-Präparation verwendet. Dabei werden die Zellen aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über eine Säule aufgereinigt. Die Übernachtskultur wird in 50ml Röhrchen überführt und bei 4000rpm für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4ml E1 Puffer resuspendiert. Die Zellen werden durch die Zugabe von 4ml E2 Puffer und einer fünfminütigen Inkubation lysiert. Anschließend wird der Ansatz durch 4ml E3 Puffer neutralisiert und die Zelltrümmer bei 4000rpm für 30min abzentrifugiert. Der klare Überstand wird auf die zuvor mit 10ml E4 Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Nachdem der Überstand durch die Säule gelaufen ist wird die Säule mit der gebundenen Plasmid-DNA zweimal mit 10ml E5 Puffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Eluation der DNA mit 6ml E6 Puffer. Zum Fällern der DNA wird 0,7 Volumenprozent Isopropanol zu dem Ansatz gegeben und die DNA bei 4000rpm für 20min gefällt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 100µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wird das Pellet für 20 min bei 37°C gelöst.

### 2.5.15 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen können doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Stellen, den Erkennungssequenzen schneiden. Dabei handelt es sich meist um palindromische kurze Nukleotidsequenzen in der DNA.

#### 2.5.15.A Analytischer Restriktionsverdau

Für den analytischen Restriktionsverdau werden 500ng DNA eingesetzt. Der Gesamtansatz beträgt 20µl, davon werden 1/10 des Volumens 10x Reaktionspuffer und 1-2 U Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der Ansatz wird 60min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 2µl 10x Probenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

#### 2.5.15.B Präparativer Restriktionsverdau

Wenn das mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Produkt zur Klonierung weiter verwendet werden soll, werden 3µg DNA eingesetzt, 1/10 des Volumens 10x Reaktionspuffer, sowie 15U der Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 50µl. Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 37°C. Der gesamte Ansatz wird anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 90 Volt aufgetrennt. Das gewünschte DNA-Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert.

### 2.5.16 Mutagenese-PCR mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen)

Indem Mutationen in eine DNA Sequenz eingebracht werden und so zum Beispiel Aminosäuren ausgetauscht werden kann die Funktion von Proteinen und ihren Proteinstrukturen genauer untersucht werden.

Um einen Aminosäuren Austausch in eine Ziel-DNA einzubringen, müssen spezielle Primer designt werden. Diese sollten eine Länge von 25 bis 45 Basen aufweisen, wobei der Basen Austausch in der Mitte der Primersequenz zu liegen kommen sollte. Außerdem müssen die Primer komplementär zueinander sein. Mit den Primern wird eine PCR durchgeführt, wobei als Template ein möglichst kurzes Plasmid genutzt wird, da das komplette Plasmid amplifiziert wird. Für die Mutagenese wird folgender PCR Ansatz genutzt:

---

5µl	10x Reaktionspuffer
5-50ng	Template Plasmid
125ng	forward Primer
125ng	reverse Primer
1µl	dNTP Mix
ad 50µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
1µl	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5U/µl)

Der Ansatz wird in einen Thermocycler gegeben und die Reaktion mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	40 sec
3. Annealing	58°C	1 min
4. Elongation	68°C	1 min pro kb des Plasmids
5. Elongation	68°C	10 min

Für die Reaktion werden die Schritte 2 bis 4 16 mal wiederholt, um einen Basen Austausch zu gewähren. Nachdem die PCR Reaktion fertig ist, muss das Template Plasmid verdaut werden, damit nur die Plasmide, welche die Mutation enthalten transformiert werden. Dafür wird zu dem Ansatz 1µl der Restriktionsendonuklease DpnI (10U/µl) gegeben. DpnI erkennt die Methylierungen des Template Plasmids und verdaut dieses. Der Ansatz wird durch bei 37°C für 1h inkubiert. Anschließend werden 1µl des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

### 2.5.17 Sequenzierung von DNA

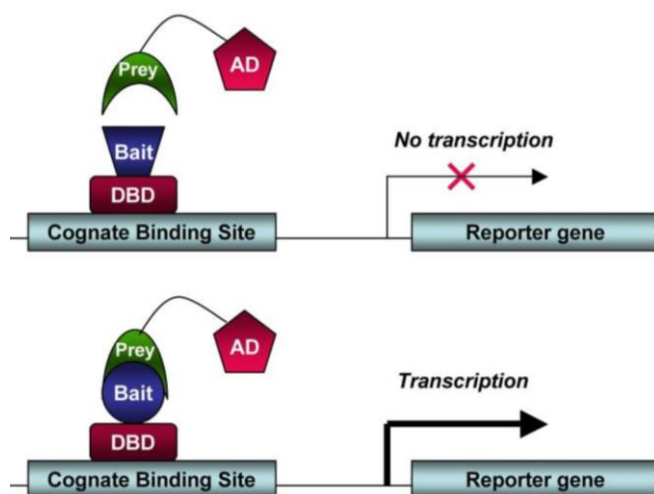
Um den Klonierungserfolg zu überprüfen werden Sequenzierungen von DNA durch die Firma LGC Genomics, Berlin durchgeführt. Für einen Sequenzierungsansatz werden 100ng/µl DNA und 20pmol der entsprechenden Primer und auf ein Gesamtvolumen von 14µl eingesetzt. Die DNA-Sequenz kann bis zu 900 Basen enthalten und kann über das Internet auf der Firmenseite abgerufen werden.

## 2.6 Das Hefe Zwei-Hybrid System

### 2.6.1 Das Prinzip des Hefe zwei Hybridsystems

(Fields und Song 1989; Gyuris et al. 1993); Matchmaker™ Gal4 Two-Hybrid System 3, Clontech Laboratories, CA nach Angaben des Herstellers)

Das Hefe-Zwei-Hybrid System ermöglicht es direkte Protein-Protein Interaktionen *in vivo* nachzuweisen. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus physiologisch trennbaren und funktionell unabhängigen Domänen bestehen. So wird der Gal4 Transkriptionsfaktor der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* genutzt, welcher aus zwei Einheiten besteht, der DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und der DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD). Die DNA-BD Domäne vermittelt die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Gal4-Promotor und die DNA-AD Domäne rekrutiert und aktiviert den Transkriptionsapparat (Abb. 14). Als Ganzes wird die Transkription aktiviert und das Gal4 Protein hergestellt, wohingegen physikalisch getrennte DNA-BD und DNA-AD Domänen nicht in der Lage sind die Gentranskription zu aktivieren. Kommen die beiden Domänen allerdings wieder in physikalische Nähe kann eine Genaktivierung stattfinden. Basierend auf diesem Prinzip wird ein Fusionsprotein hergestellt, welches entweder die DNA-BD (Köderprotein, *bait*) oder die DNA-AD (Beuteprotein, *prey*) Domäne trägt. Es werden beide für die Fusionsproteine kodierenden Expressionsvektoren in einen Hefestamm transformiert. Wenn es zu einer Interaktion zwischen beiden Proteinen kommt, führt dies zu einer Expression der stromabwärts liegenden Reportergene (*his3*, *ade2*, *mel1*, *lacZ*). Die Interaktion kann zum einen über das Wachstum der Hefezellen auf verschiedenen Selektionsmedien (*his3*, *leu2*) und auch über die Enzymaktivität (*mel1*, *lac1*) nachgewiesen werden.



**Abb. 14: Schematische Darstellung des Hefe-2-Hybrid Systems.** (A) Wenn die zu untersuchenden Fusionsproteine, welche entweder die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) oder die DNA-Bindedomäne (DBD) tragen, nicht miteinander interagieren, werden die Reportergene *ade* und *MEL1* nicht transkribiert. Es kommt dadurch weder zum Wachstum noch zu einer Blaufärbung der Kolonien auf der Selektionsplatte. (B) Bei einer Interaktion kann die Aktivierungsdomäne an die Bindedomäne binden was zu einer Expression der Reportergene

führt. Die Interaktion ist durch ein Wachstum zusammen mit einer Blaufärbung der Hefe auf der Selektionsplatte ablesbar (Ratushny und Golemis 2008).

### 2.6.2 Herstellung von Hefenährmedien

Die Hefe wird zur Anzucht auf YPDA-Vollmedium Platten (Yeast Peptone Dextrose) ausgestrichen, welches alle essentiellen Kohlenstoff und Stickstoffquellen, essentielle Aminosäuren, sowie Basen enthält. Bei dem Hefe-Ausgangsstamm handelt es sich um eine Mangelmutante, welche ohne die Aufnahme der Expressionsvektoren nicht in der Lage ist auf Mangelmedien zu wachsen. Zunächst werden über ein Mangelmedium (Selektionsplatten) die Hefezellen selektioniert, welche beide Expressionsvektoren aufgenommen haben, anschließend werden diese auf Platten mit einem verstärkten Mangelmedium (Induktionsplatten) ausgestrichen, auf welchen dann auch eine Protein-Protein Interaktion festgestellt werden kann. Das System basiert darauf, dass die transformierten Hefezellen mit Hilfe von Auxotrophiemarker auf die Aufnahme der Expressionsvektoren getestet werden können. Dafür werden synthetische Minimalmedien (DO-Medium, Synthetic Dropout) verwendet, welche durch die Zugabe von verschiedenen Einzelamino-säuren, sowie Zuckerlösung und Basen auf die gewünschte Selektion angepasst werden können.

### 2.6.3 Anzucht der Hefekultur

Eine dauerhafte Lagerung des Hefeausgangsstammes ist bei  $-80^{\circ}\text{C}$  als Glycerinstock möglich. Der Arbeitsstock wird auf eine YPDA-Platte ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$



inkubiert, bis Einzelkolonien einen Durchmesser von 2 bis 3mm erreicht haben. Die weitere Lagerung erfolgt bei 4°C.

#### 2.6.4 Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (PEG/LiAc-Methode)

Nach Gietz et al. (1992) und Ito et al. (1983)

Damit Hefezellen Plasmid-DNA aufnehmen können müssen sie kompetent gemacht werden. Dafür werden 50 ml YPDA-Medium mit einer frischen 2 bis 3mm großen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 250rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Kultur sollte dabei nicht länger als 16h wachsen, da sonst zu viele tote Hefen in der Kultur vorhanden sind. Am nächsten Tag werden 300ml frisches, vorgewärmtes YPDA-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die Kultur wird bei 30°C und 250rpm 3 bis 4 Stunden inkubiert, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht hat. Anschließend wird die Kultur auf 50ml Falcons aufgeteilt und bei 2000rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 50ml ddH<sub>2</sub>O vereint und erneut bei 2000rpm für 5 min pelletiert. Die Hefezellen werden in 2ml 1x TE/LiAc (1M) aufgenommen, um diese chemisch kompetent zu machen. So vorbereitet bleiben die Hefezellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur kompetent.

Die verschiedenen Transformationsansätze werden in Reaktionsgefäßen angesetzt. Es werden 1µg des DNA-AD Konstrukts (pGADT7) und 1-2µg des DNA-BD Konstruktes (pGBKT7) eingesetzt, sowie 100µg denaturierte Lachssperma-DNA als Träger-DNA zugesetzt, dazu kommen jeweils 100µl der kompetenten Hefezellen. Der Ansatz wird gemischt und mit jeweils 600µl frisch angesetzter PEG/LiAc-Lösung versetzt und durch invertieren gut durchmischt. Es folgt eine Inkubation bei 30°C für 40 min bei 250rpm, anschließend werden zu jedem Transformationsansatz 70µl DMSO gegeben und durch invertieren gemischt. Dann erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min und anschließend werden sie 2min auf Eis heruntergekühlt. Die Zellen werden bei 2000rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit H<sub>2</sub>O für 5 min bei 2000rpm gewaschen. Der Überstand wird abgenommen und die Hefezellen in 150µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Der Ansatz wird anschließend auf Selektionsplatten mit Hilfe von Glaskugeln ausgebracht und diese bei 30°C inkubiert.

### 2.6.5 Test der Kotransformanten auf Proteininteraktion

Nach 3-4 Tagen auf 30°C sind 2-3mm große Hefekolonien auf den Selektionsplatten zu sehen. Hefezellen ohne oder mit nur einem Konstrukt können auf den Selektionsplatten aufgrund der fehlenden Auxotrophiemarker nicht wachsen. Somit enthalten alle Hefekolonien auf den Selektionsplatten beide auf Interaktion zu testende Konstrukte. Die Kolonien werden einzeln auf eine Induktionsplatte (je 6-8 Kolonien pro Test) ausgestrichen und erneut bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert. Anschließend werden die Platten ausgewertet. Wenn die Hefezellen wachsen und eine Blaufärbung aufweisen zeigt dies eine positive Interaktion an. Findet hingegen keine Interaktion statt, sollten die Hefen auf den Induktionsplatte keinerlei Wachstum zeigen.

## 2.7 *Drosophila* SL2 Zellkultur

### 2.7.1 Stammhaltung und Passagieren von *Drosophila* SL2 Zellen

Die Haltung von *Drosophila* SL2 Zellen erfolgt bei 25°C in einer sterilen Kulturflasche im Inkubator. Da diese Suspensionszellen nur geringfügig adhären ist ein Verdau mit Trypsin zum Passagieren der Zellen nicht nötig. Sobald die Zellen dicht gewachsen sind werden sie durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kulturflasche gelöst und zu Bestimmung der Zellzahl 1/10 im Kulturmedium verdünnt. Die Verdünnung wird in einer Hälber-Zählkammer ausgezählt. Dabei ergibt sich die Zellzahl der Kultur aus folgender Formel: Mittelwert der vier gezählten Quadrate x Verdünnungsfaktor (10) x  $10^4$  (Kammerfaktor)

Zur Stammhaltung werden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät.

### 2.7.2 Transfektion von *Drosophila* SL2 Zellen

Um die Zellen zu transfizieren werden pro Transfektionsansatz  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Wellplatten (Sarstedt, Nürnberg) ausgesät und über Nacht bei 25°C wachsen gelassen. Um eine Transfektion zu ermöglichen wird FuGENE<sup>HD</sup> (Promega) verwendet. Es handelt sich um eine nicht-liposomale Transfektion. Der Vorteil dieses Systems ist eine hohe Transformationseffizienz, sowie eine geringe Toxizität. Das Kulturmedium und FuGENE<sup>HD</sup> werden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und 4,5µl davon sowie 1,5µg DNA (0,5µg/µl pro Ansatz) zusammen gemischt, anschließend werden 20µl Kulturmedium dazu gegeben. Das

Verhältnis beträgt dabei 3:1 zur benötigten DNA. Für den Ansatz werden 0,5µg DNA von jedem Konstrukt und 0,5µg actGal4 (konstitutiver Promotor) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel vorher ist nicht notwendig. Die Zellen werden für 48h bei 25°C inkubiert.

### 2.7.3 Formaldehyd-Fixierung und Antikörperfärbung von *Drosophila* SL2 Zellen

Zunächst wird eine sterile 24 Wellplatte mit Glasplättchen bestückt, dann werden diese mit 120µl Poly-L-Lysin beschichtet und bei RT 20min inkubiert. Eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin ist notwendig, um die Zellen an die Glasplättchen anzuheften. Nachdem der Überstand von Poly-L-Lysin abgenommen wurde, werden die transfizierten Zellen in die Wells gegeben und für weitere 90min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit adhärieren die Zellen an die Glasplättchen. Anschließend werden diese fixiert. Dafür werden die Zellen zunächst für 5min mit 500µl 1x PBS gewaschen und anschließend für 15min mit 4% F-PBS fixiert. Die Zellen werden 2x 5min mit 1x PBS gewaschen. Damit Antikörper ins Zellinnere diffundieren können werden die Zellen für 2,5min mit 0,5% Triton/1x PBS permeabilisiert. Die Zellen werden danach erneut 2x 5min mit 1x PBS gewaschen und anschließen zum maskieren unspezifischer Bindungen mit 3% BSA/1x PBS inkubiert. Falls erforderlich erfolgt anschließend eine Antikörperfärbung. Dafür werden die Glasplättchen aus der Wellplatte entnommen und in einer Feuchtkammer transferiert. Zunächst werden die Zellen in 30µl Erstantikörper/1x PBS für 2h inkubiert, anschließend 3x mal mit 1x PBS gewaschen und dann für 1h in 30µl Zweitantikörper/1x PBS inkubiert. Ist das transfizierte Konstrukt ein Fusionsprotein mit einem Fluoreszenzanhang kann dieses direkt am Mikroskop nachgewiesen werden. In beiden Fällen kann zusätzlich noch eine Phalloidin- und DAPI-Färbung erfolgen, um einmal das Aktin-Zytoskelett und den Zellkern nachzuweisen. Die Zellen werden dafür erneut 3x in 1x PBS gewaschen und in 30µl Phalloidin-TRITC (1:200) und DAPI (1:100) für 15 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen nach erneutem Waschen mit 1x PBS und H<sub>2</sub>O in FluoromountG<sup>TM</sup> auf Objektträgern eingebettet.

## 2.8 Vertebraten Zellkultur

### 2.8.1 Etablierung und Stammhaltung primärer Mausmyoblasten

In Kultur genommene Mausmyoblasten bieten ein gutes Modell um die Auswirkung von zum Beispiel einer siRNAi oder Inhibitor Applikation auf den Fusionsprozess von Myoblasten zu untersuchen. Damit lässt sich die Funktion von fusionsrelevanten Proteinen näher beschreiben.

Zunächst müssen die Mausmyoblasten aus dem Gewebe isoliert werden. Dafür werden 3-4 Wochen alte Mäuse durch eine cervicale Dislokation euthanasiert. Anschließend wird die gesamte Maus mit 70% Ethanol eingesprüht. Die Haut wird von der Hüfte an abwärts bis zur Pfote entfernt. Die Faszien, welche die Muskelgruppen umgeben werden ebenfalls entfernt. Mit Hilfe steriler Scheren und Pinzetten werden folgende Muskeln entfernt: Hamstring-Muskelgruppe, Quadrizeps, Tibialis, EDL, Gastrocnemius, Soleus und Gluteus. Dabei sollte so viel wie möglich an Fett- und Bindegewebe entfernt werden. Die Muskeln werden in sterile Zellkulturschälchen auf Eis gelagert bis alle Mäuse präpariert wurden. Dabei werden die Muskeln verschiedener Mäuse getrennt gelagert. Alle folgenden Schritte erfolgen unter einer Zellkultur-Werkbank. Unter Zuführung von vorgewärmter CollagenaseB/CaCl<sub>2</sub> Lösung werden die Muskeln mit einer sterilen Schere in so kleine Stücke wie möglich zerkleinert und anschließend für 12min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird durch auf und abpipettieren weiter homogenisiert und anschließend für weitere 12min inkubiert. Der Enzymverdau wird durch die Zugabe von 6ml Complete Groth Medium (CGM) gestoppt und die Lösung in ein 15ml Falcon überführt. Nach 5min sollten sich die größeren Gewebstücke abgesetzt haben und die Lösung wird über ein 70µm Filter in ein 50ml Falcon überführt. Der Filter wird mit 6ml CGM gespült und die Zellsolution in ein 15ml Falcon überführt. Die Zellen werden für 5min bei 1400rpm pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen werden in 4ml frischem CGM resuspendiert und auf nicht beschichtete 10cm Platten ausgesät und bei 37°C inkubiert. Dabei adhären Fibroblasten am Boden wobei Myoblasten im Überstand verbleiben. Nach 1 ½ Stunden wird der Überstand auf zwei frische mit Collagen beschichtete 6cm Platten ausgesät und 2cm CGM zugegeben. Das Medium wird nach 3 Tagen gewechselt und die Zellen sobald sie eine Konfluenz von 80% erreicht haben auf eine neue Platte transferiert. Um möglichst nur die Myoblasten und nicht die Fibroblasten auf eine frische Platte zu transferieren wird das Medium abgenommen, die Platte mit 1xPBS gewaschen. Anschließend werden 500µl 1xPBS auf die

Platte gegeben und nach 2-3 Minuten die Platte an der Seite einige Male fest angeschlagen. Die gelösten Zellen werden zunächst für 15min auf eine unbeschichtete Platte inkubiert und anschließend der Überstand auf eine frische mit Collagen beschichtete Platte gegeben, 3,5ml CGM zugefügt und die Zellen bei 37°C inkubiert. Das CGM wird alle zwei Tage gewechselt und die Zellen erneut nach oben beschriebene Protokoll auf eine frische Platte transferiert, bis keine Fibroblasten mehr vorhanden sind.

### **2.8.2 Einfrieren und Auftauen primäre Mausmyoblasten**

Frühestens ab der fünften Passage können die primären Mausmyoblasten eingefroren werden. Dafür sollten sie eine Konfluenz auf 10cm Platten von etwa 70% erreicht haben. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden mit 1,5ml vorgewärmten 0,25% Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in CGM mit 10% DMSO gelöst und in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Diese werden dann zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren bevor sie am folgenden Tag in flüssigem Stickstoff gelagert werden können.

Bei Bedarf können die Myoblasten wieder aufgetaut werden. Dafür wird CGM auf 37°C vorgewärmt und die Zellen in dem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß solange in 37°C warmen Wasser geschwenkt bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist. Die Zellen werden in ein 15ml Falcon überführt und 10ml vorgewärmtes CGM dazu gegeben und für 5min bei 1200rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 15ml vorgewärmten CGM resuspendiert und auf drei mit Collagen beschichtete 10cm Platten aufgeteilt. Zu jeder Platte werden jeweils 3ml vorgewärmtes CGM gegeben und die Platten in den Inkubator gegeben. Das Medium wird alle 3-4 Tage gewechselt, die Zellen können bei einer Konfluenz von ca. 70% gesplittet werden oder für Experimente differenziert werden.

### **2.8.3 Differenzierung von primären Mausmyoblasten**

Wenn die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht haben werden sie wie oben beschrieben abtrypsiniert und mit CGM so verdünnt, dass sie eine Konfluenz von 60-70% in 24 Well Platte erreichen. Die Wells werden entweder mit Collagen (Kontrollgruppe) oder mit Matigel beschichtet und die Zellen für 4-6 Stunden im Inkubator gelagert. Das erlaubt den Zellen sich am Untergrund anzuheften. Das Medium wird nun vorsichtig entfernt und entweder je 1ml frisches

vorgewärmtes CGM auf die Kontrollgruppe oder Differenzierungsmedium auf die Zellen gegeben. Matigel und das Differenzierungsmedium erlauben den Zellen sich zu differenzieren und miteinander zu fusionieren. Die Medien werden alle 24 Stunden gewechselt nach 2-3 Tagen je nach gewünschter Differenzierung können die Zellen fixiert werden und verschiedene Proteine über eine Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden.

#### **2.8.4 Inhibitor Anwendung an primären Mausmyoblasten**

Die Funktion von bestimmten Proteinen kann über Inhibitoren entweder eingeschränkt oder weitest gehend unterbunden werden. Dafür werden die Zellen zunächst wie zuvor beschrieben in 24 Well Platten ausgesät. Zusätzlich zum vorgewärmten CGM oder Differenzierungsmedium wird der Inhibitor (Mdivi-1 in DMSO gelöst) in der gewünschten Konzentration beziehungsweise das gleiche Volumen von DMSO für die Kontrollgruppe auf die Zellen gegeben. Diese werden solange geschwenkt bis sich das DMSO gut im Medium gelöst hat und die Zellen im Inkubator gelagert. Mit jedem Mediumwechsel erfolgt auch die Zugabe von frischen DMSO oder Inhibitor. Nach 2-3 Tagen, sobald die Kontrollgruppe den gewünschten Differenzierungsgrad erreicht hat, können die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden.

#### **2.8.5 Immunfluoreszenzfärbung von primären Mausmyoblasten**

Wenn die Zellen den gewünschten Grad der Differenzierung erreicht haben wird der Überstand verworfen und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in frisch verdünnten 4% FPBS für 15min bei RT fixiert. Anschließend werden sie 3-mal für 10min mit 1xPBS gewaschen und dann mit 0,25% Triton/1x PBS für 2,5min permeabilisiert. Die Zellen werden erneut 3-mal für 10min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wird der 1. Antikörper in PBS verdünnt auf die Zellen gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Der 1. Antikörper wird 3 mal 10min abgewaschen bevor der 2. Antikörper in PBS auf die Zellen gegeben und diese für 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert werden. Nach erneuten 3maligen waschen kann zusätzlich noch eine DAPI und Phalloidin Färbung erfolgen. Dafür wird DAPI und Phalloidin (1:100) in 1xPBS verdünnt und die Zellen für 20min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen werden erneut 3-mal gewaschen und können anschließend in Fluoromount™ eingebettet werden.

## 2.9 Longitudinale und transversale Paraffinschnitte an adulter Flugmuskulatur

(nach Kucherenko et al. 2010)

### 2.9.1 Fixieren und Einbetten adulter Fliegen in Paraffin

Paraffindünnschnitte eignen sich sehr gut um die Struktur der adulten Flugmuskulatur zu untersuchen sowie die Lokalisation einzelner Proteine zu bestimmen. Dafür wird zunächst ein Schlitten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Halyna Shcherbat, MPI Göttingen) unter dem Binokular aufrecht stehend und mit der Öffnung nach oben zeigend mit Klebeband befestigt. Anschließend werden die Fliegen mit CO<sub>2</sub> betäubt und falls nötig nach Männchen und Weibchen sortiert. Falls eine der genutzten Gal4-Treiber auf dem X-Chromosom liegt, sollten nur Weibchen verwendet werden. Es werden 15-20 Fliegen in einen Schlitten eingeklemmt, sodass das Abdomen in den Schlitten und Thorax und Kopf außerhalb des Schlittens zu liegen kommen. Die Schlitten werden dann in einem Gemisch aus absoluten Ethanol, Chloroform und Essigsäure in einem Verhältnis von 6:3:1 (Carnoy's Lösung) gelegt um die Fliegen über Nacht bei 4°C darin zu fixieren. Am nächsten Tag werden die Fliegen in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die Schlitten werden dafür zunächst zweimal 10min in 70% Ethanol sowie zweimal 10min in 100% Ethanol überführt. Anschließend werden sie jeweils 30min bei 60-65°C in Methylbenzoat und 1:1 Methylbenzoat/Paraffin inkubiert und schließlich zweimal je eine Stunde in Paraffin inkubiert. In der Zwischenzeit können je nach gewünschter Orientierung der Flugmuskulatur Folienschälchen hergestellt werden. Dafür werden die Schälchen entweder als Quader mit einer hohen oder kurzen Front aus doppelt gelegter verstärkter Alufolie gefaltet. Dabei ist der Quader mit der hohen Front für transverse und der Quader mit der kurzen Front für longitudinale Schnitte geeignet. Die Schlitten mit den Fliegen werden so in die Folienschälchen platziert, dass der Kopf und Thorax zur Öffnung des Schälchens zeigt. Dann wird das Schälchen zügig mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Wichtig ist, dass das Paraffin welches die Proben umgibt nicht schon vor dem Auffüllen des Schälchens beginnt fest zu werden, da dies zu einem Herausbrechen der Proben beim Schneiden führt. Falls Schälchen auslaufen sollten, kann der Schlitten in ein neues Folienschälchen platziert werden. Die aufgefüllten Schälchen werden über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet.

### 2.9.2 Paraffindünnschnitte adulter Flugmuskeln

Die Paraffinblöcke werden aus den Folienschälchen befreit und für das Schneiden am Mikrotom vorbereitet. Dabei wird zunächst überschüssiges Paraffin entlang des Schlittens weggeschnitten und schließlich der Schlitten vorsichtig mit der Hilfe eines Skalpells von den Proben getrennt. Das Paraffin, welches die Probe auf der einen Seite noch umgibt wird mit Hilfe einer Bügelklinge konisch zugeschnitten. Dabei muss genau darauf geachtet werden, dass die Paraffinkante zu der Probenkante parallel geschnitten wird um beim Schneiden möglichst keine größeren Überlappungen der Proben zu erhalten. Anschließend können die so zugeschnittenen Paraffinblöcke in das Mikrotom eingespannt werden. Die Schnittkante der Probe sollte möglichst parallel zur Mikrotomklinge sein. Die Schnittdicke für die Flugmuskulatur beträgt 7µm. Die Probe wird fortlaufend geschnitten, wobei jeder Schnitt an der vorherigen Kante haftet. Dadurch entsteht ein Probenteppich, welcher nach etwa 20 Schnitten mit Hilfe eines Pinsels von der Klinge des Mikrotoms gelöst werden kann und vorsichtig in ein 37°C warmes Wasserbad überführt wird. Die Schnitte haben so einmal die Möglichkeit sich durch die Wärme gerade zu ziehen und das Wasserbad bietet eine einfache Möglichkeit die Probe auf einen beschichteten Objektträger aufzubringen (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific). Die Proben müssen nun entweder über Nacht bei Raumtemperatur trocknen oder können, falls sie sich im Wasserbad nicht ausreichend gerade gezogen haben und die Proben keinen gleichmäßigen Kontakt mit der Oberfläche des Objektträgers haben, für 15-60min bei 60°C inkubiert werden.

### 2.9.3 Hämatoxylin- und Eosinfärbung an Paraffindünnschnitten

Die Proben müssen zunächst vom Paraffin befreit werden. Dazu werden sie jeweils zweimal 4min in Xylol getaucht. Anschließend folgt eine absteigende Ethanolreihe um die Proben zu rehydrieren. Dafür werden die Proben zunächst zweimal in 100% Ethanol für je 4min, dann einmal 3min in 95% Ethanol, einmal 3min in 70% Ethanol inkubiert und zum Schluss einmal 1min in H<sub>2</sub>O inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation für 7min in einer Hämatoxylin-Färbelösung nach Meyer um die Zellkerne sichtbar zu machen. Das überschüssige Hämatoxylin wird unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen bis das Wasser klar beleibt. Um im weiteren Verlauf eine schönere Differenzierung der Färbung zu erhalten, werden die Proben kurz in eine Differenzierungslösung getaucht und anschließend für 8-10min unter laufendem



Leitungswasser der Überschuss gewegewaschen. Es erfolgt für 1-2min eine Inkubation in eine Eosin-Färbelösung um eine Gegenfärbung des Zytoplasmas zu erhalten. Der Überschuss wird zunächst durch 18-mal eintauchen in 70% Ethanol ausgewaschen und die Proben anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Darauf erfolgt eine 30sekündige Inkubation in 96% Ethanol, sowie einmal 2min und einmal 4min Inkubation in 100% Ethanol. Die Proben werden dann zweimal je 4min in Xylol inkubiert bevor sie in DPX Mount eingebettet werden können. Die Präparate müssen über Nacht unter einem Abzug fest werden.

#### **2.9.4 Immunfluoreszenzfärbung an Paraffindünnschnitten**

An Paraffinschnitten kann auch ein Nachweis von zu untersuchenden Proteinen durchgeführt werden. Die Proben werden dafür zunächst zweimal 4min in Xylol inkubiert um die Proben zu deparaffinieren. Anschließend werden die Proben über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert. Dafür werden die Proben zunächst zweimal in 100% Ethanol für je 4min, dann einmal 3min in 95% Ethanol, einmal 3min in 70% Ethanol inkubiert. Anschließend werden sie viermal für jeweils 15min in 1xPBT inkubiert. Die Proben werden für eine Stunde in 2%NGS inkubiert um unspezifische Proteinbindestellen abzudecken. Anschließend wird der 1. Antikörper über Nacht in 1xPBT auf die Proben gegeben. Am nächsten Tag werden die Proben viermal für jeweils 15min gewaschen bevor der 2. Antikörper in 1xPBT auf die Proben gegeben wird. Die Inkubationszeit hängt dabei vom Antikörper ab. Entweder werden die Proben für 3 Stunden bei RT oder über Nacht inkubiert. Der 2. Antikörper wird mit 1x PBT für 15min abgewaschen und es kann im Anschluss eine Phalloidin- und DAPI-Färbung (1:200 und 1:500) für 20min erfolgen. Die Proben werden erneut zweimal für 15min in 1xPBT gewaschen und können anschließen in FluoromountG<sup>TM</sup> eingebettet werden.

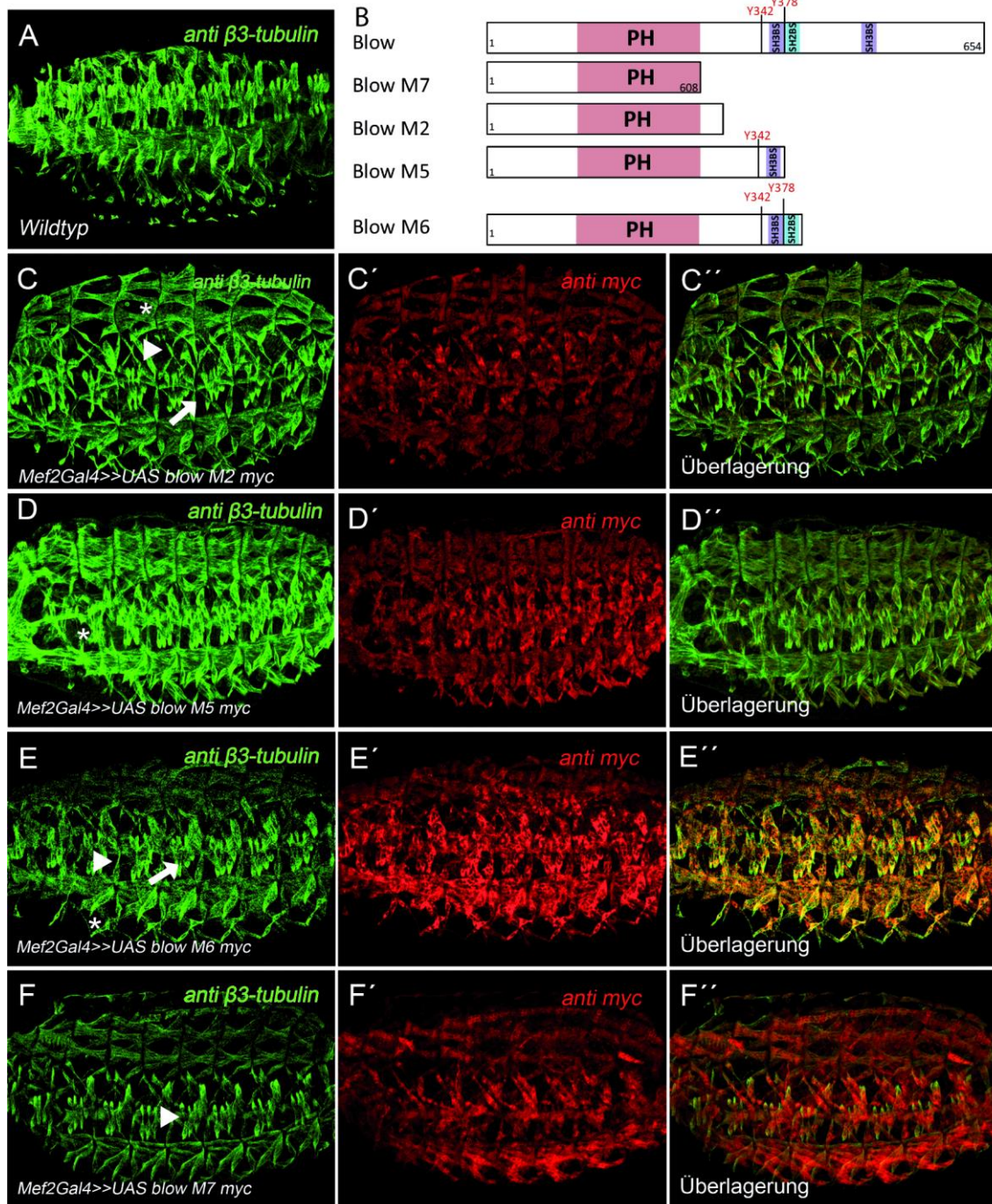
#### **2.10 Internet- Quellen**

Flybase	<a href="http://flybase.org/">http://flybase.org/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez</a>
Smart – Proteindomänenvorhersage	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Expression von Blow Deletionskonstrukten führt zu einem leichten Defekt in der Entwicklung der Muskulatur

Das für die Myoblastenfusion essentielle Protein Blow ist ein Regulator der F-Aktin Reorganisation. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass es mit Wip eine direkte Protein Interaktion eingeht. Dafür entscheidend scheinen sowohl die N- als auch C-terminale Region von Blow zu sein (Jin et al. 2011). Des Weiteren wird die Interaktion zwischen Blow und Crk über die SH2-Domäne und der ersten SH3-Domäne von Crk vermittelt. Dabei scheint die Phosphorylierung von Y378 essentiell für die Vermittlung dieser zu sein (Jin et al. 2011). Blow besitzt eine PH-Domäne am N-terminus sowie zwei SH3-Bindestellen (BS), welche eine SH2-BS umschließen (Abb. 1B). Zu weiteren Analyse von essentieller Regionen innerhalb des Blow-Proteins wurden verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt, welche in Abb. 15B dargestellt sind (Blow Deletionskonstrukte und Nomenklatur: Masterarbeit M. Rüden 2013). Alle Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe von Mef2Gal4 in allen Myoblasten im Embryo exprimiert. In *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M2-myc* getriebenen Embryonen konnten vereinzelt vorliegenden unfusionierte FCM (Sternchen) beobachtet werden, auch erscheinen die Muskeln dünner im Vergleich zum Wildtyp (Pfeilkopf), es fehlen vereinzelt Muskeln (Pfeil) und es scheint teilweise ein Defekt in der epidermalen Anheftung vorzuliegen (Abb. 15C, Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M5-myc* exprimierte Embryonen zeigen einen etwas schwächer ausgeprägt Fusionsdefekt als *Mef2>>UAS-blow-M2-myc* (Abb. 15D, Sternchen). In *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M6-myc* getriebenen Embryonen kommt es zu teilweise dünner ausgeprägten Muskeln (Pfeilkopf), es liegen vereinzelt unfusionierte FCM vor (Sternchen) und es scheint zusätzlich ein leichter Defekt in der Anheftung vorzuliegen (Abb. 1E, Pfeil). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M7-myc* in allen Myoblasten zeigt von allen Deletionskonstrukten den schwächsten Phänotyp. Hier wirken die Muskeln dünner als im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15F, Pfeilkopf).



**Abb. 15: Die Expression von Blow-Deletionskonstrukten mit Hilfe von Mef2Gal4 führt zu leichten Defekten in der Formation der Muskeln.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurde mittels Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta 3$ -Tubulins sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). Eine Übersicht der verwendeten Deletionskonstrukte von Blow ist in B dargestellt. Dabei sind in lila beide SH3BS und in blau die SH2BS dargestellt. *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M2-myc* exprimierende Embryonen zeigen vereinzelt unfusionierte FCM (C, Sternchen), teilweise dünner ausgeprägten Muskeln (Pfeilkopf) und einem Defekt in der epidermalen Anheftung (Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M5-myc*

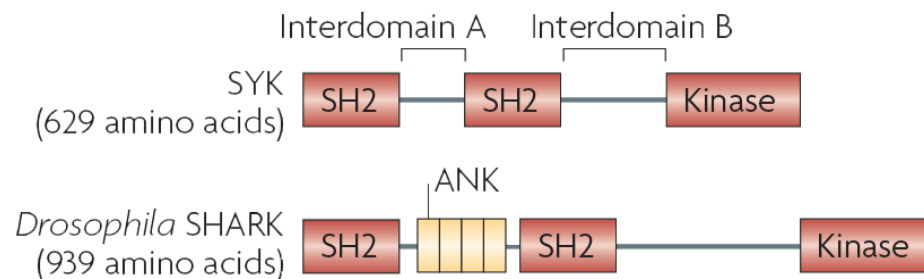
exprimierende Embryonen zeigen einen deutlichen Fusionsdefekt (D, Sternchen). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M6-myc* führt vereinzelt zu unfusionierte FCM (E, Sternchen), dünnere Muskeln (Pfeilkopf) und einen Anheftungsdefekt auf (Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M7-myc* exprimierende Embryonen zeigt im Vergleich dazu den schwächsten Phänotyp mit dünner ausgeprägten Muskeln (F, Pfeilkopf).

Alle Deletionskonstrukte weisen eine zytoplasmatische Lokalisation auf (Abb. 15C'-F'). Blow lokalisiert im Wildtyp in einem Fokus an der Kontaktstelle zwischen FC/wachsender Myotube und FCM (Hornbruch-Freitag et al. 2011). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Lokalisation in den exprimierten Deletionskonstrukten dem des wildtypischen Blow entspricht. Für einen Vergleich fehlt die Lokalisation des Blow-fl-myc Fusionsproteins. Dieses sollte der Lokalisation des endogenen Blow entsprechen. Eine Studie zur Lokalisierung der Blow Deletionen steht zurzeit noch aus und könnte Aufschluss darüber geben, welche Regionen im N-terminalen Bereich für die Funktion von Blow relevant sind. Die Expression des Deletionskonstrukts *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M2-myc* in allen Myoblasten der Embryonen weist den stärksten Phänotyp auf gefolgt von *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M5-myc* und *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M6-myc*. Dies könnte im Zusammenhang mit den Phosphorylierungsstelle Y342 und Y378 stehen, welche in *UAS-blow-M2-myc* nicht mehr vorhanden sind.

### 3.2 Ein Hefe-2-Hybridsceen identifiziert die Tyrosinkinase Shark als potentiellen Blow Interaktionspartner

Es konnte bislang gezeigt werden, dass Blow über seine Interaktion mit Wip die Dynamik der durch den WASp-Wip Komplex initiierten Verzeigung von Aktinfilamenten stark beeinflusst (Jin et al. 2011). Ultrastrukturelle Analysen von *blow*-, *wasp*- und *wip*-Mutanten zeigen allerdings, dass *blow*-Mutanten während einem früheren Zeitpunkt des Fusionsprozesses stoppen als dies bei *wasp*- und *wip*-Mutanten der Fall ist. *blow*-Mutanten stoppen dabei während der Etablierung des Präfusionskomplexes (siehe Einleitung 1.2), während *wasp*- und *wip*-Mutanten erst während der Vesikularisierung der Membranen stoppen (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Massarwa et al. 2007). Dies wirft die Frage auf, ob Blow außer an der F-Aktin Reorganisation auch noch an der F-Aktin Bildung und Auflösung der elektronendichten Vesikel beteiligt ist. Eine Möglichkeit Einblicke in weitere Funktionen von Blow zu erhalten, ist die Identifizierung potentieller

Interaktionspartner. Daher wurde ein Hefe-2-Hybridscreen mit Hilfe einer embryonalen *Drosophila* Hefe Datenbank durchgeführt (Masterarbeit Papendieken 2013). Zwei der interessantesten potentiellen Interaktionspartner für Blow sind zum einen die Tyrosinkinase Shark und zum anderen das mitochondrielle Regulatorprotein Drp1. Im ersten Teil dieser Arbeit wird zunächst die biochemische und genetische Interaktion zwischen Blow und Shark analysiert. Die *Drosophila* nicht-receptor Tyrosinkinase Shark ist das Vertebraten Homologe zu Syk (Mocsai et al. 2010; Scheib et al. 2012). Syk besitzt zwei SRC homology 2 (SH2)-Domänen am N-terminus sowie eine Kinase-Domäne am C-terminus. Shark dagegen besitzt zusätzlich dazu noch vier Ankyrin-ähnliche (Ank) Wiederholungen zwischen beiden SH2-Domänen (Siehe Abb. 16; Mocsai et al. 2010). Syk wird durch die Bindung an phosphorylierte Tyrosine im sogenannten immunreceptor-tyrosin-based-activation-motif (ITAM) aktiviert. Wobei auch eine Phosphorylierung von Tyrosinen in der Interdomäne A und B führt zur Aktivierung von Syk führt, unabhängig von der Interaktion mit dem ITAM (Mocsai et al. 2010).



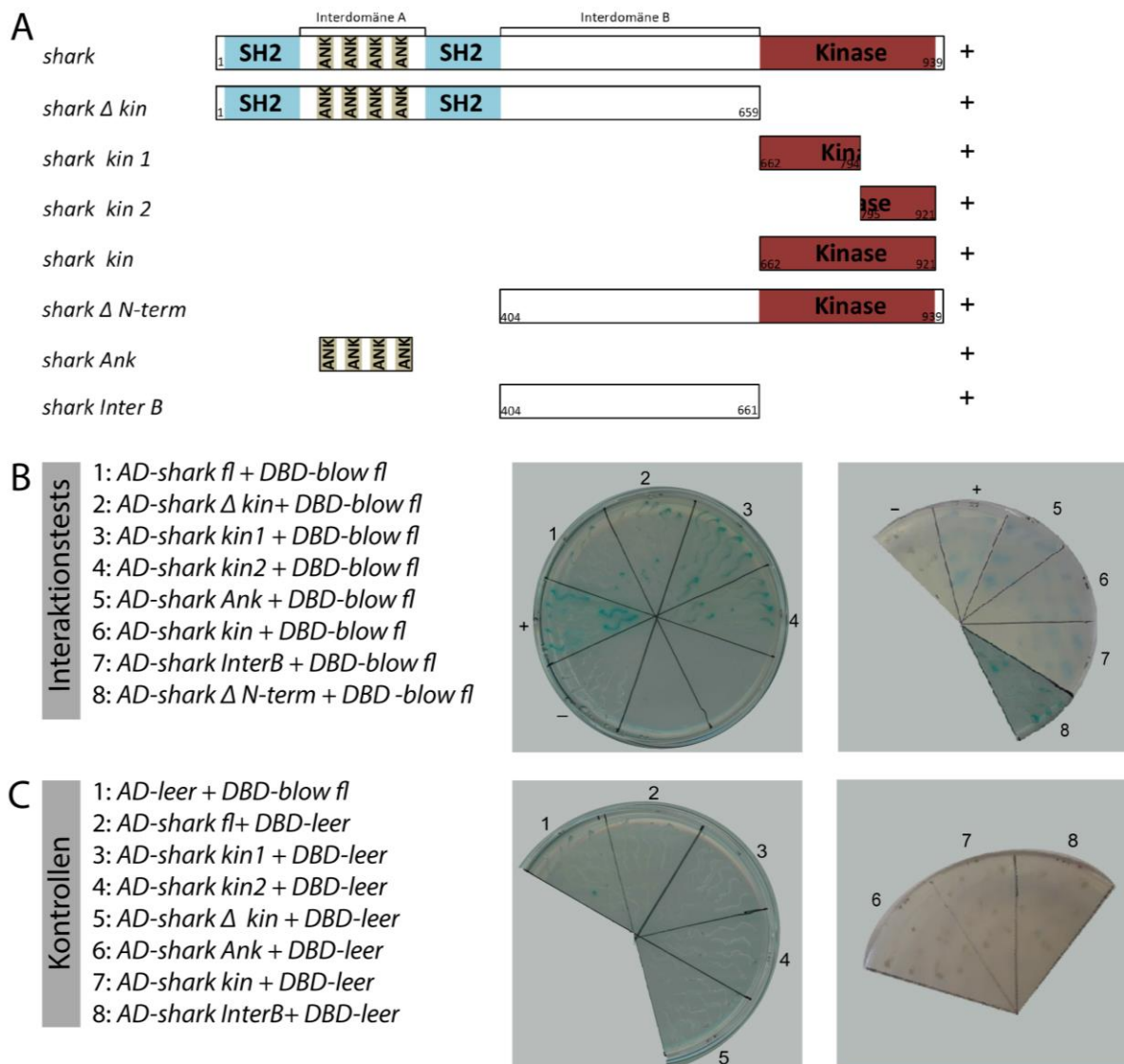
**Abb. 16: Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Shark und Syk.** Syk besitzt N-terminal zwei SH2-Domänen getrennt von der Interdomäne A. Zwischen der zweiten SH2-Domäne und der C-terminalen Kinase-Domäne liegt die Interdomäne B. Im Gegensatz dazu besitzt Shark zusätzlich vier Ank Wiederholungen und eine längere Interdomäne B (modifiziert nach Mocsai et al. 2010).

### 3.3 Eine Interaktion von Blow und Shark ist unabhängig von einer spezifischen Domäne von Shark

Für Shark konnte bereits gezeigt werden, dass die *shark* mRNA während der embryonalen Entwicklung sowohl im somatischen als auch viszerale Mesoderm detektierbar ist. Während fusionsrelevanten Stadien lokalisiert die mRNA in den Myoblasten und wachsenden Muskeln (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). Zunächst wurde die Protein-Interaktion zwischen Blow

und Shark noch einmal bestätigt. Dafür wurde der gesamte verfügbare offene Leserahmen (*fulllength*, fl) von *blow* und *shark* in die Hefe-Expressionsvektoren pGADT7 (enthält die Aktivierungsdomäne, AD) und pGBKT7 (enthält die DNA-Bindedomäne, BD) kloniert und diese in Hefe co-exprimiert (*shark fl* Konstrukt hergestellt Masterarbeit K. Fritzen 2013). Wachstum und Blaufärbung der transformierten Hefe bestätigte die Interaktion zwischen Blow und Shark (Abb. 2B). Um die Region einzugrenzen, welche die Interaktion auf Seiten von Shark vermittelt, wurden zunächst verschiedene Deletionskonstrukte von Shark gegen *blow fl* getestet (*blow fl* in pGBKT7 (BK)) Konstrukt hergestellt in Masterarbeit M. v. Rügen). Alle Deletionskonstrukte von *shark* sind in Abb. 17A dargestellt. Von Interesse war zunächst die Kinasedomäne von Shark, da die im Hefe-2-Hybrid Screen nachgewiesene Interaktion auf einem Fragment von ungefähr 800bp, welches die Kinasedomäne beinhaltete, beruhte (Masterarbeit Papendieken 2013). Eine Co-Expression der vollständigen Kinasedomäne von *shark* und *blow fl* bestätigte dabei die Daten des Hefe-2-Hybrid screens (Abb 17B). Auch beide Hälften der Kinasedomäne (*kin1* und *kin2*) alleine zeigten dabei eine Interaktion mit *blow fl* (Abb 17B). Mit Hilfe eines *shark* Deletionskonstruktes, dem die vollständige Kinasedomäne fehlte konnte, gezeigt werden, dass sich die Interaktion nicht auf die Kinasedomäne alleine beschränkt (Abb. 17B). Im Anschluss wurden weitere *shark* Deletionskonstrukte getestet. Eine Interaktion war auch nachweisbar, wenn der N-terminale Part von *shark* fehlte (Abb. 17B). Für das Vertebraten Homolog Syk konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungen der Interdomäne B ebenfalls zu einer Aktivierung führen (Mocsai et al. 2010). Für Shark konnten kürzlich auch einige potentielle Phosphorylierungsstellen in der Interdomäne B identifiziert werden. Basierend darauf wurde getestet, ob die Interdomäne B alleine auch in der Lage ist eine Interaktion mit Blow zu vermitteln. Auch dies konnte bestätigt werden (Abb. 17B). Die Co-Expression der Ank-Wiederholungen alleine zeigte ebenfalls eine Interaktion mit Blow (Abb. 17B). Alle Kontrollen co-exprimiert mit den entsprechenden Leervektoren zeigten keine Autoinduktion des Hefe-2-Hybrid Systems (Abb. 17C).

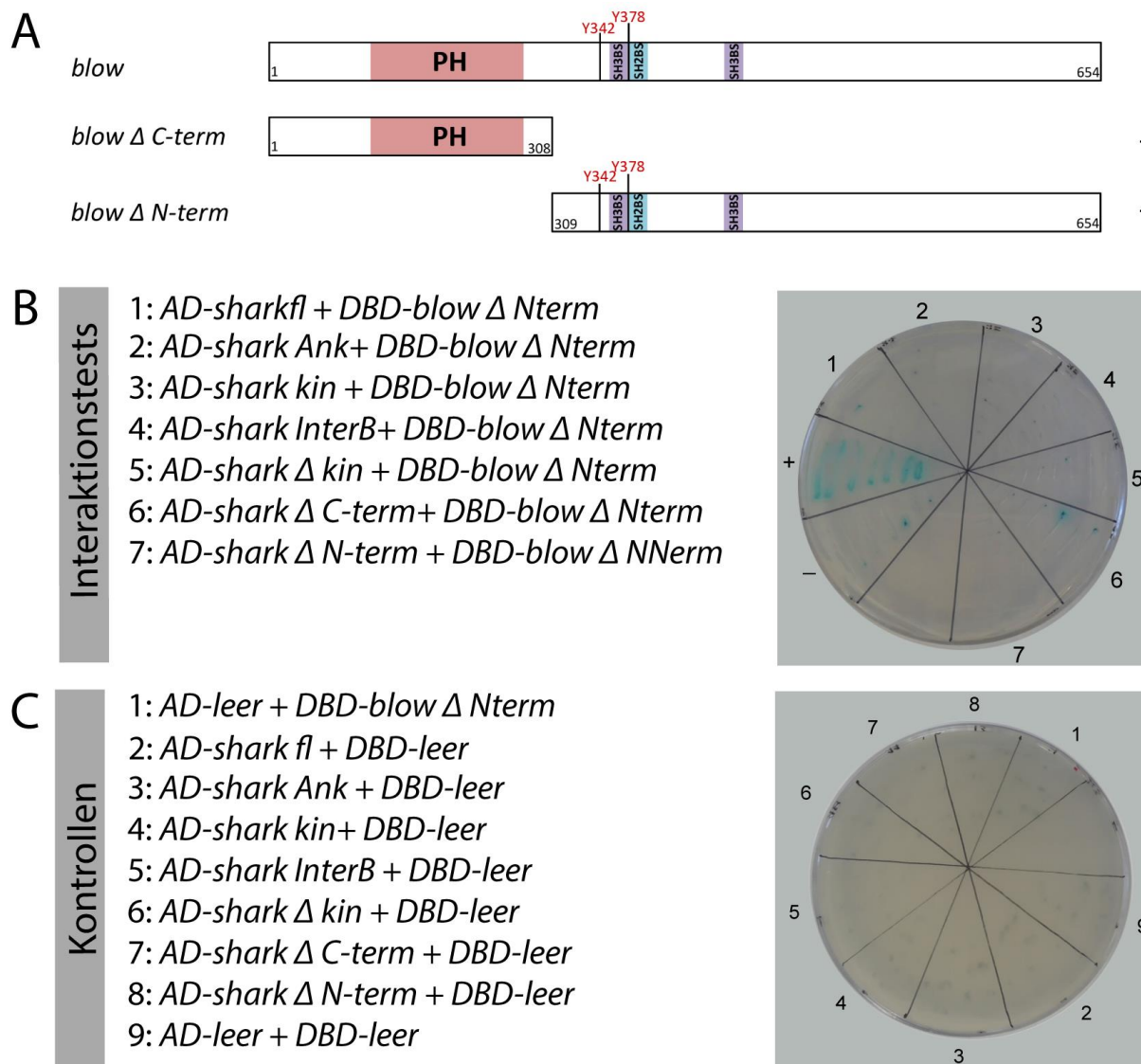




**Abb. 17: Alle Shark Deletionskonstrukte interagieren mit Blow.** Eine schematische Übersicht aller generierten *shark*-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit dem *blow*-Konstrukt sind in A dargestellt. Mit einem (+) ist die Interaktion der Shark-Deletionskonstrukte mit Blow gekennzeichnet. Alle getesteten Shark Deletionskonstrukte (B1-8) interagieren mit Blow. Nummer 8 interagiert nicht stärker. Alle Tests auf Autoinduktion (C1-8) sind negativ gewesen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.

Auf Seiten von Shark konnte keine Region bestimmt werden, welche für die Interaktion mit Blow essentiell zu sein scheint. Daher wurde im Folgenden getestet, ob auf Seiten von Blow eine Region essentiell für die Interaktion mit Shark ist. Dafür wurde zwei Deletionskonstrukte von Blow kloniert. Eines dem der N-terminale Bereich des gesamten offenen Leserahmens fehlt und eines dem der entsprechende C-terminale Bereich fehlt. Im N-terminalen Bereich liegt die

PH-Domäne und im C-terminalen Bereich beide SH2-BS, die SH3-BS sowie beide putative Phosphorylierungsstellen. Alle Deletionskonstrukte von *blow* sind in Abb. 18A dargestellt. Es konnte keine Interaktion zwischen dem N-terminal deletierten Blow (*Blow*  $\Delta$  N-term) und Shark festgestellt werden (Abb. 18B).

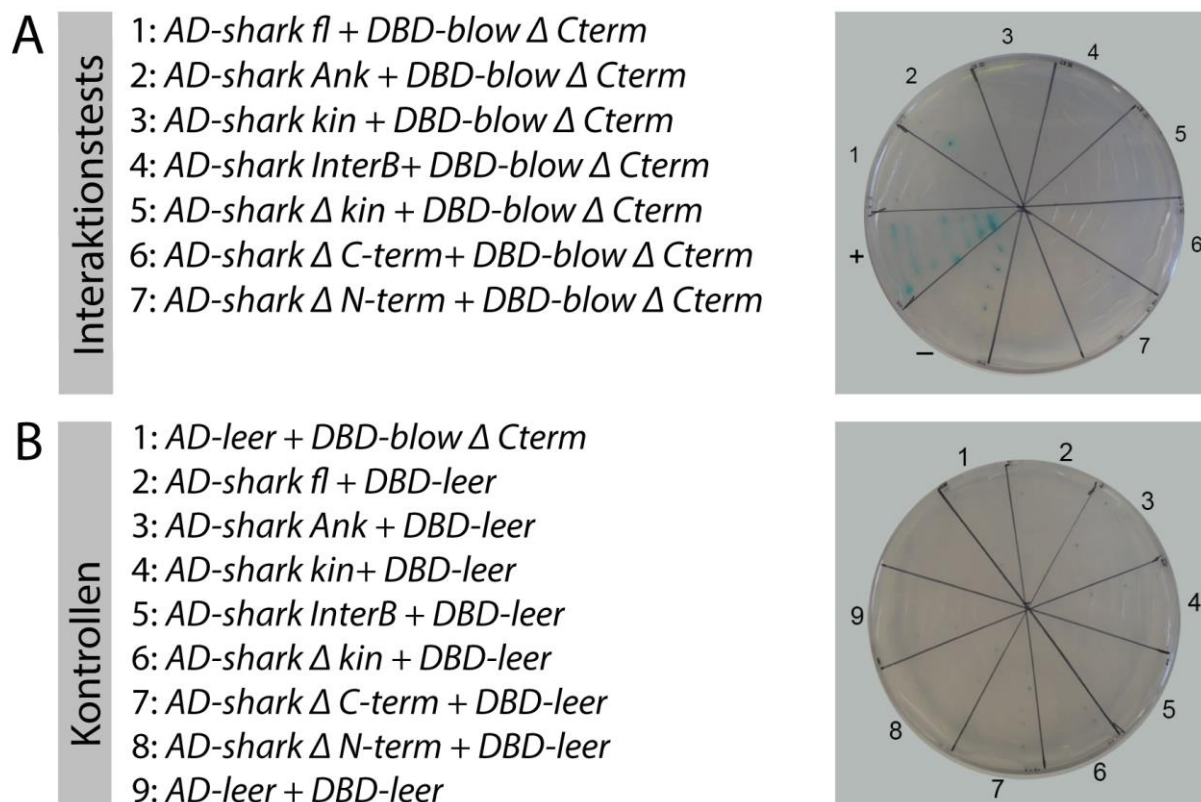


**Abb. 18: Der C-terminale Bereich von Blow scheint für eine Interaktion mit Shark nicht ausreichend zu sein.**

Eine schematische Übersicht aller generierten *blow*-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit dem *blow*-Konstrukten sind in A dargestellt. Mit einem (-) ist die Interaktion der Blow-Deletionskonstrukte mit den Shark-Deletionskonstrukten gekennzeichnet. Es konnte keine Interaktion zwischen *Blow*  $\Delta$  N-term und den *shark*-Konstrukten festgestellt werden. Alle Tests auf Autoinduktion (C1-8) sind negativ gewesen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.



Es konnte ebenfalls keine Interaktion zwischen dem C-terminal deletierten Blow (*blow*  $\Delta$  C-term) und Shark festgestellt werden (Abb. 18D). Auch Interaktionstests mit Deletionskonstrukten von Shark gegen Blow  $\Delta$  N-term und Blow  $\Delta$  C-term zeigten keine Interaktion (Abb. 19B, D).



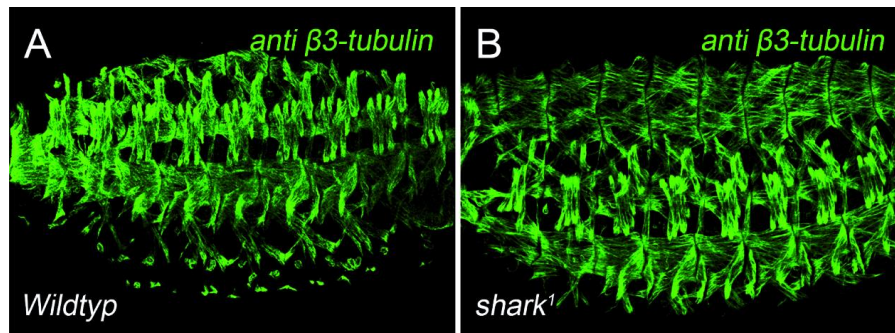
**Abb. 19:** Auch der N-terminale Bereich von Blow scheint für eine Interaktion mit Shark nicht ausreichend zu sein. Eine schematische Übersicht aller generierten *blow*-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit dem *shark*-Konstrukten sind in 3A dargestellt. Es konnte keine Interaktion zwischen Blow  $\Delta$  C-term und den *shark*-Konstrukten festgestellt werden. Alle Tests auf Autoinduktion (B1-9) sind negativ gewesen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.

Dies deutet darauf hin, dass auf Seiten von Blow sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich des Proteins für eine Interaktion mit Shark essentiell ist. Für Shark konnte keine Domäne oder Region bestimmt werden, welche essentiell für die Vermittlung der Interaktion zwischen Blow und Shark ist. Alle für Shark getesteten Deletionskonstrukte zeigten eine Aktivierung der Reportergene des Hefe-2-Hybrid Systems und wiesen somit auf eine Interaktion mit Blow hin. Da es eher unwahrscheinlich ist, dass alle getesteten Deletionskonstrukte und damit alle Regionen von Shark alleine in der Lage sind mit Blow zu

interagieren, deutet es darauf hin, dass Shark entweder ein möglicherweise falsch positiver potentieller Interaktionspartner von Blow ist oder die gewählten Deletionskonstrukte zusammen mit Blow zu einer Autoaktivierung der Hefe Reportergene führt. Aus diesem Grund sollte die Interaktion zwischen Blow und Shark mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Geeignet dafür, wäre eine Co-Immunopräzipitation von Blow und Shark, zum Beispiel als Proteinextrakt aus Co-transfizierten SL2 Zellen. Dieses Experiment wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es konnte bis jetzt nur ein Antikörperrnachweis des Blow Fusionsproteins (UAS-Blow-eGFP), nicht jedoch für das Shark Fusionsprotein (UAS-Shark-Myc) erbracht werden. Aufgrund dessen wurde der Versuch eingestellt. Die Frage danach, welche Rolle Shark genau während der Myoblastenfusion einnimmt, bleibt jedoch weiterhin bestehen. *shark*-Mutanten zeigen zwar keinen Fusionsdefekt, allerdings zeigen Beispiele von fusionsrelevanten Proteinen, dass hier möglicherweise eine funktionelle Redundanz bestehen könnte (Dissertation Freitag 2013). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass Shark am Zell-Zellkontakt in FCM lokalisiert, was einen Hinweis auf die Beteiligung von Shark am Fusionsprozess liefert (Dissertation Freitag 2013).

### 3.4 Eine Expression von Shark Deletionen führt zu einem Defekt während der Myoblastenfusion

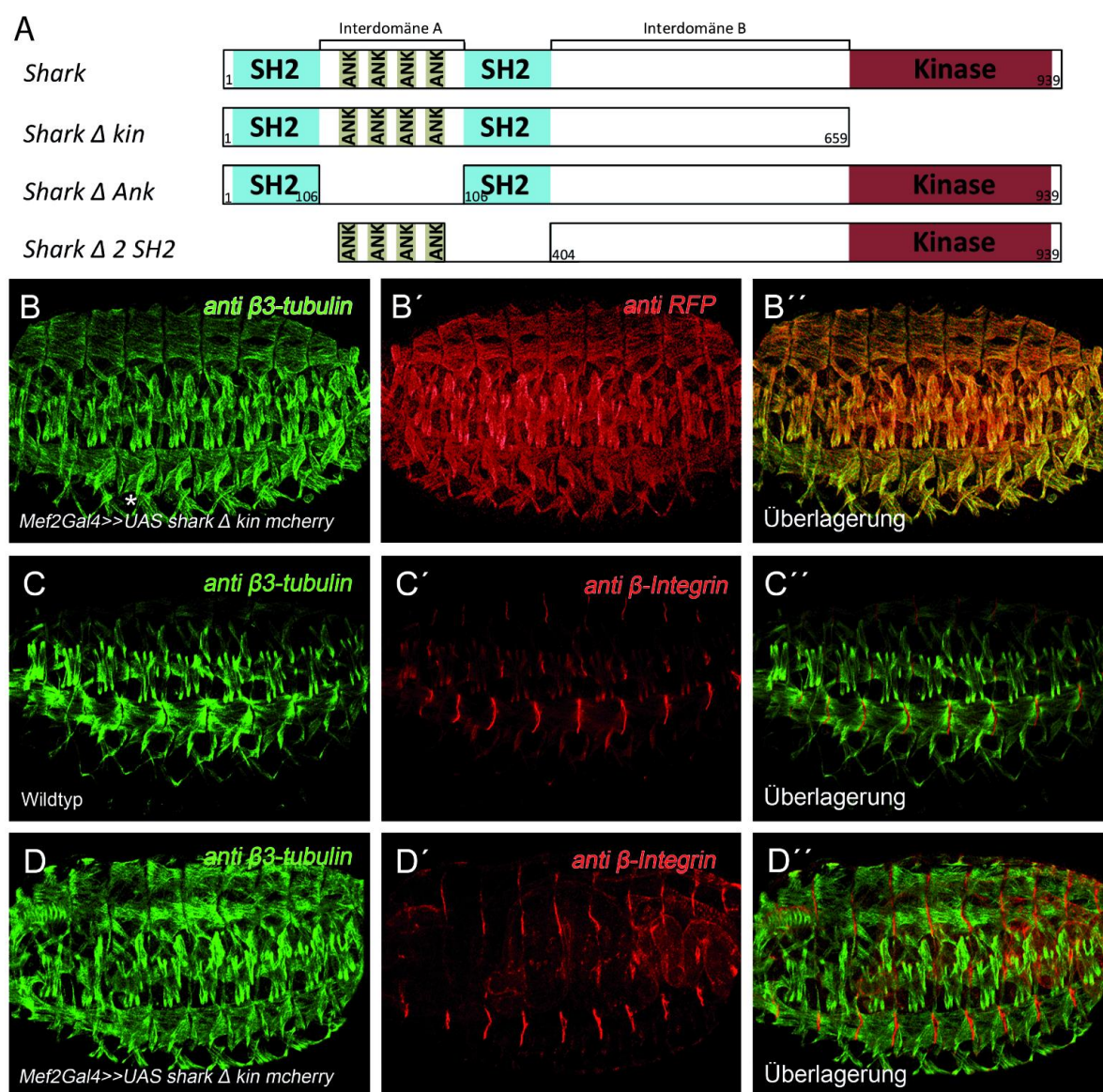
Da Shark während der Myoblastenfusion in FCMs exprimiert wird, wurde als nächstes Shark Deletionen erstellt, um die Funktion von Shark während der Myoblastenfusion genauer zu studieren. Dafür wurden drei verschiedene Deletionskonstrukte erstellt, der offene Leserahmen dieser wurde in einen pUAS<sub>T</sub> oder pUAS<sub>Sp</sub>-Expressionsvektor mit einem C-terminalen mCherry- oder 10x Myc-Anhang kloniert. Die in *Drosophila* eingebrachten Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe des UAS-Gal4 Systems mit einer Mef2Gal4 Treiberlinie Myoblasten-spezifisch im Embryo exprimiert. Alle Myoblasten wurden mittels eines Antikörperrnachweises gegen  $\beta$ 3-Tubulin sichtbar gemacht und zusätzlich der Tag der Fusionsproteine mit einem Antikörperrnachweis gegen mCherry oder Myc sichtbar gemacht. Die Embryonen wurde dabei mit Wildtyp-Embryonen und der *shark<sup>l</sup>*-Mutante verglichen (Abb. 5). *shark<sup>l</sup>*-Mutanten weisen keinen Defekt in der Formation der Muskulatur auf und zeigen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Muskelmuster (Abb. 20 A, B).



**Abb. 20: *shark<sup>1</sup>* Mutanten weisen keinen Fusionsdefekt auf.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurde mittels des muskelspezifischen  $\beta 3$ -Tubulins Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). *shark<sup>1</sup>*-Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp keinen Fusionsdefekt, weisen allerdings einen Dorsalschlussdefekt auf (B, nicht gezeigt).

Eine Übersicht aller Deletionskonstrukte ist in Abb. 21A dargestellt. Zuerst wurde getestet, ob der Verlust der Kinasedomäne einen Einfluss auf die Funktion von Shark am Zellkontakt *in vivo* hat, da die Tyrosinkinasedomäne die Interaktions-vermittelnde Domäne des Hefe-2-Hybrid Screens war. Falls die Kinasedomäne von Shark entscheidend für die Interaktion zwischen Blow und Shark während der Fusion ist, würde man einen Defekt in der Entwicklung der Muskulatur erwarten. Mittels eines anti-Shark Antikörpernachweises konnte gezeigt werden, dass Shark am Zellkontakt während der Fusion in FCM lokalisiert. Was einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von Shark an der Myoblastenfusion aufgezeigt hat (Dissertation Freitag 2013). Des Weiteren resultierte eine Expression von *UAS-shark-fl-myc* mittels der FCM-spezifischen SnsGal4 Treiber-Linie ebenfalls in einer Lokalisation von Shark am Zellkontakt (Dissertation Freitag 2013). Zum Vergleich für die Lokalisation weiterer während dieser Arbeit generierter Shark-Konstrukte wurde das Experiment wiederholt. Es war jedoch nicht möglich in *sns-Gal4>>UAS-shark-fl-myc* getriebenen Embryonen den Myc-Tag nachzuweisen. Um festzustellen welche Region von Shark wichtig für die Myoblastenfusion ist, wurden Shark-Deletionskonstrukte erstellt. Diese sind in Abb. 21A dargestellt. In *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* getriebene Embryonen lokalisiert Shark  $\Delta$  kin-mCherry zytoplasmatisch und weist keine Akkumulation am Zellkontakt auf (Abb. 21C). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* in allen Myoblasten führt zu keinem Fusionsdefekt. Die Embryonen weisen vereinzelt unfusionierte FCM auf (Abb. 21B, Sternchen), insgesamt entspricht das Muskelmuster dem des Wildtyps (Abb. 21C). Weiterhin wurde über ein

Antikörpernachweis von  $\beta$ PS2-Integrin überprüft, ob alle Muskeln ihre epidermale Anheftungsstelle erreichen.  $\beta$ PS2-Integrin lokalisiert an der epidermalen Seite der Tendons, somit lässt sich verfolgen ob eine Überschneidung von  $\beta$ 3-Tubulin und  $\beta$ PS2-Integrin an den epidermalen Anheftungsstellen zu beobachten ist. In *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* exprimierenden Embryonen konnte kein Anheftungsdefekt im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 21C, D).

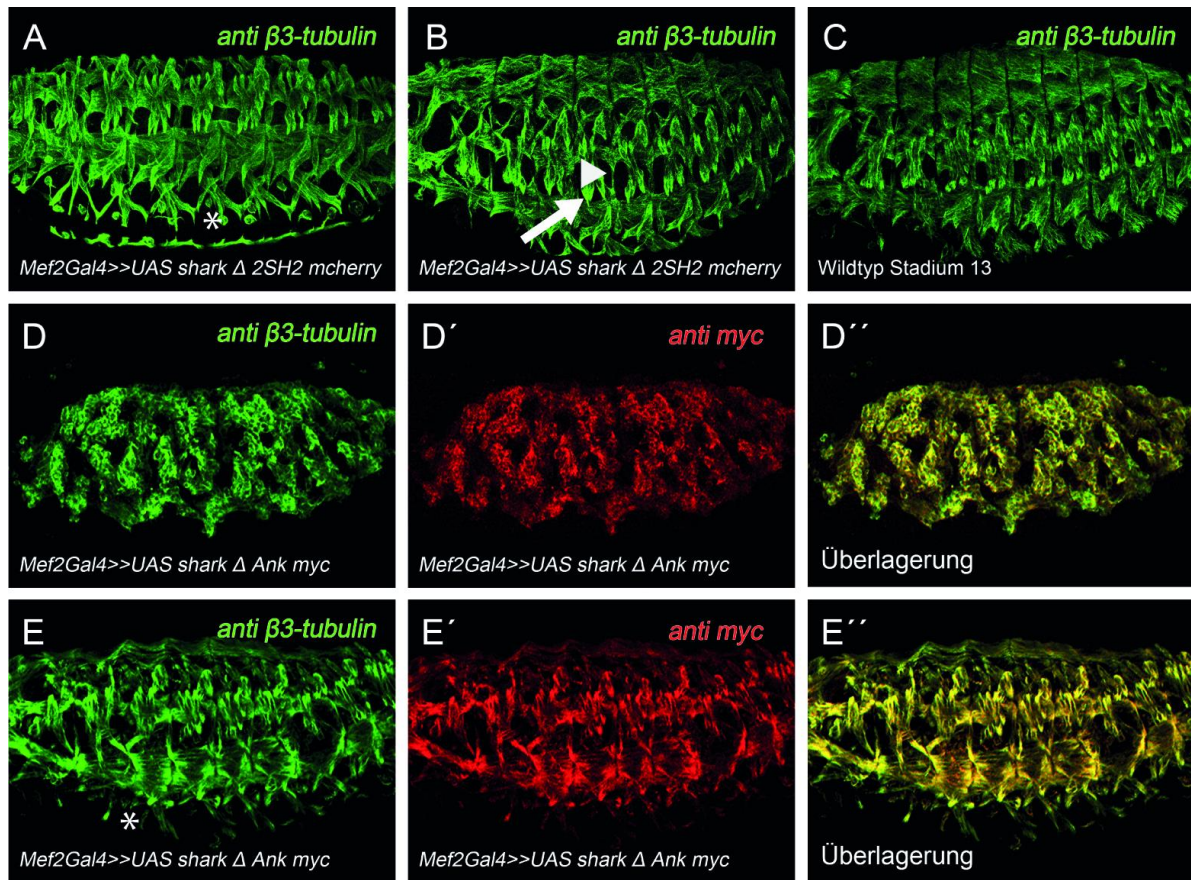


**Abb. 21: Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* führt zu leichten Fusionsstörungen.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. In A ist eine schematische Übersicht der generierten

Shark-Deletionskonstrukte dargestellt. In dem dargestellten *UAS-shark Δ Ank* Konstrukt folgen beide SH2-Domänen direkt hintereinander, genauso wie *UAS-shark Δ 2SH2* Konstrukt beide SH2-Domänen hintereinander folgen. *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebene Embryonen weisen vereinzelt unfusionierte FCM auf (B, Sternchen). Ein Antikörperrnachweis von mCherry des Fusionsproteins mittels RFP zeigt eine zytoplasmatisch Lokalisation (B'). Ein Antikörperrnachweis am Wildtyp (C) sowie *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebene Embryonen mittels βPS2-Integrin zeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp alle epidermalen Anheftungsstellen erreicht werden (D).

Für das Vertebraten Homolog Syk konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der Ank Wiederholungen oder beider SH2-Domänen zu einer Aktivierung von Syk führt (Rolli et al. 2002). Basierend darauf wurden zwei Deletionskonstrukte erstellt, denen entweder die Ank-Wiederholungen oder beide SH2-Domänen fehlen (Abb. 7A). Myoblasten-spezifisch exprimiert wäre es möglich, dass beide Fusionsproteine konstitutiv-aktiv wirken könnten und dann erwartungsgemäß zu einem Defekt während der Entwicklung der Myoblastenfusion führen würden, sofern Shark nach dem gleichen Prinzip wie Syk wirkt. Eine Expression von *UAS-shark Δ 2SH2-mcherry* in allen Myoblasten resultiert in einigen der Embryonen in einem Fusionsdefekt mit einigen unfusionierten FCM (Abb. 22E, Sternchen). Einige der Embryonen zeigen auch eine keulenförmig ausgeprägte ventral-lateral Muskulatur (Abb. 22F, Pfeile). Des Weiteren scheinen die Muskeln im anterioren Bereich dünner als im Wildtyp zu sein. *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ Ank-myc* exprimierenden Embryonen weisen einen sehr deutlichen Defekt während der Myoblastenentwicklung auf. Einige der Embryonen weisen Probleme beim Keimstreifenrückzug auf. Der Phänotyp könnte auch darauf hindeuten, dass teilweise keine korrekte Determination von FC und FCM mehr zu erfolgt, was überprüft werden sollte. Andere zeigen eine deutlich verzögerte Entwicklung im Vergleich zu Wildtyp Embryonen im gleichen Entwicklungsstadium (Abb. 22G, H). Weitere Embryonen lassen ein sehr ungeordnetes Muskelmuster erkennen mit einigen unfusionierten FCM (Abb. 22I, Sternchen).





**Abb. 22: Die Expression von UAS-shark  $\Delta$  Ank mcherry führt zu einem starken Defekten während der Muskelentwicklung.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. In Abb. 6A ist eine schematische Übersicht der generierten Shark-Deletionskonstrukten dargestellt. *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  2SH2 mcherry* exprimierende Embryonen weisen einige unfusionierte FCM (A, Sternchen), keulenförmig ausgeprägte ventral-laterale Muskeln (B, Pfeil) sowie dünnere Muskeln im anterioren Bereich auf (B, Pfeilkopf). *Mef2-Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  Ank-myc* exprimierende Embryonen zeigen teilweise Defekte im Keimstreifrückzug und in der Determination von FC und FCM (D) mit einer deutlichen Verzögerung in der Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp (C). Einige Embryonen zeigen ein ungeordnetes Muskelmuster mit einigen unfusionierten FCM (Sternchen). Ein Antikörperrnachweis von Myc des Fusionsproteins mittels eines Myc spezifischen Antikörpers zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation (D', E').

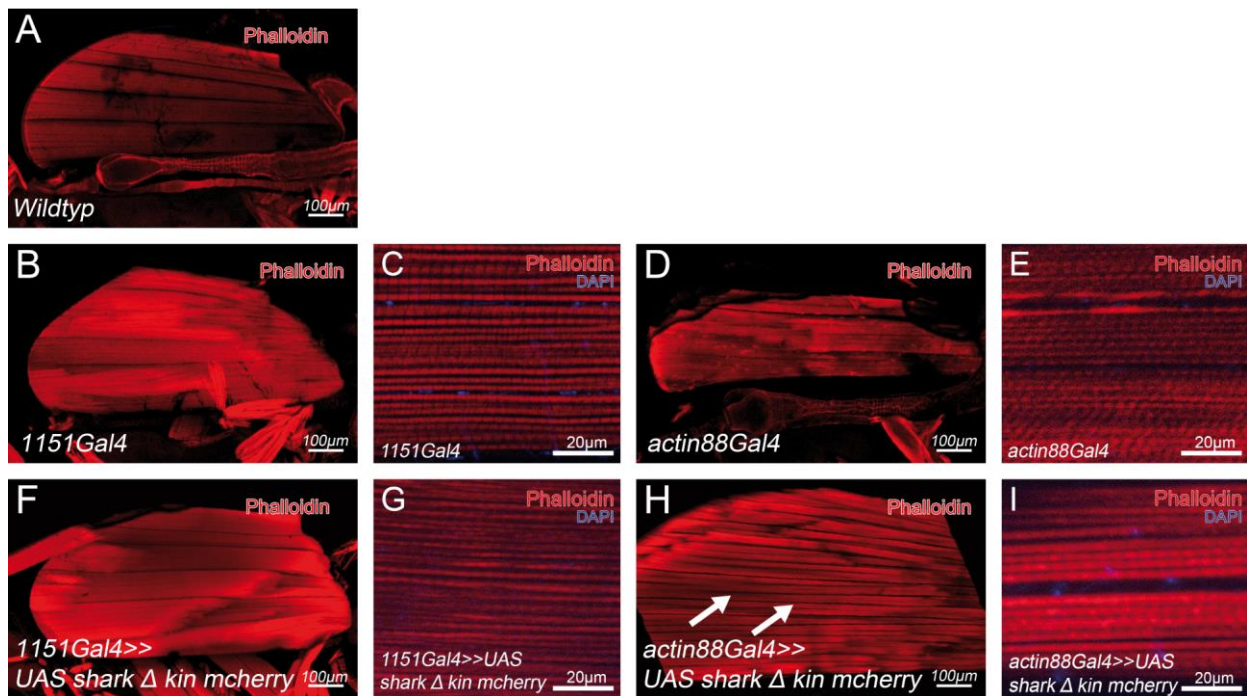
Sowohl SH2-Domänen als auch Ank-Wiederholungen sind Domänen die Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Dabei erkennen SH2-Domänen phosphorylierte Tyrosine und sind häufig in Adapterproteinen, zu finden (Koytiger et al. 2013). Der unterschiedlich stark ausgeprägte Defekt während der Myoblastenentwicklung beider Konstrukte, könnte auf

verschiedene Rollen der SH2-Domänen und der Ank-Wiederholungen von Shark während des Fusionsprozesses hindeuten.

### 3.5 Eine Expression von Shark scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung der adulten IFM zu haben

*In situ*-Hybridisierung von Wildtyp Embryonen mit einer *shark*-RNA Sonde zeigt, dass die *shark* mRNA bereits im synzytialen Blastoderm vorhanden ist (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). Studien an WASp, einem Aktivator des Arp2/3-Komplexes zeigen, dass die maternal bereitgestellte mRNA eines Proteins bis zu fusionsrelevanten Stadien nachweisbar sein kann (Ben-Yaacov et al. 2001; Schafer et al. 2007). Dies kann dazu beitragen, dass der Verlust des Proteins zu keinem oder einem nur sehr schwach ausgeprägten Defekt während der Myoblastenfusion führt, da die maternale mRNA in ausreichender Menge vorliegt, um die Embryogenese abzuschließen (Berger et al. 2008). Während der Metamorphose findet eine Umwandlung der embryonalen Muskulatur in die adulte Muskulatur statt. Dabei fusionieren, beispielsweise bei der Entwicklung der IFM, Myoblasten mit Vorläuferzellen um die adulte Muskulatur zu bilden. Bei diesem Prozess ist keine maternale Komponente mehr involviert. Aus diesem Grund wurde getestet inwieweit die Expression von *UAS-shark Δ kin-mcherry* die adulte Myoblastenfusion beeinflusst. Dazu wurde die zuvor beschriebene *UAS-shark Δ kin-mcherry* Fliegenlinie verwendet und diese mit Hilfe von zwei verschiedenen, für die adulte Flugmuskulatur spezifischen Treiberlinien, exprimiert. Verwendet wurden dafür 1151Gal4 sowie Actin88Gal4. 1151Gal4 wird in allen adulten Muskelvorläuferzellen (AMPs) exprimiert. Eine für die indirekte Flugmuskulatur spezifische Treiberlinie ist dagegen Actin88Gal4, welches nach der Anheftung der Myotuben ab etwa 18 Stunden nach Verpuppung (after puparianformation, APF) aktiv ist (Weitkunat und Schnorrer 2014). *UAS-shark Δ kin-mcherry* wurde entweder mit 1151- oder Actin88Gal4 in den Puppen getrieben und die wenige Tage alten adulten Fliegen fixiert und mit einem Skalpell lateral halbiert. Die Muskulatur sowie die Zellkerne wurden mit Phalloidin und DAPI sichtbar gemacht. Im Folgenden deuten teilweise abgerissene Fragmente einzelner Muskeln auf keinen Phänotyp hin, da dies auf die präparative Vorgehensweise zurückgeführt werden kann. Betrachtet werden im weiteren Verlauf die dorsal-longitudinalen Muskeln (DLM). Als Kontrolle wurden beide homozygoten Treiberlinien verwendet und im Vergleich zum

Wildtyp betrachtet (Abb. 23A-E). Homozygote 1151Gal4 Fliegen sind in der Anzahl der Muskeln sowie des Filamentaufbaues mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb. 23A-C). Etwas anders sieht dies bei homozygoten actin88Gal4 Fliegen aus. Diese weisen teilweise kleinere Akkumulationen von F-Aktin in den einzelnen Muskeln auf, wobei sie sonst mit dem Wildtyp vergleichbar sind (Abb. 23D, E, Pfeil). Gegen den Wildtyp ausgekreuzte Fliegen weisen dagegen keine Akkumulation von F-Aktin auf (Abb. 23F-I). Die Expression von *UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* mit Hilfe von 1151Gal4 beeinflusst die Entwicklung der Muskulatur und den Aufbau der korrekten Filamentstruktur in keiner Weise (Abb. 23F,G). Im Gegensatz dazu, scheint die Expression von *UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* mit Actin88Gal4 dazu zu führen, dass der Zusammenhalt der einzelnen Aktinfilamente nur noch teilweise gewährleistet wird (Abb. 23H,I, Pfeil). Die Sarkomerstruktur bleibt dabei intakt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kinaseaktivität von Shark für das korrekte Alignment der F-Aktinfasern eine Rolle spielt.

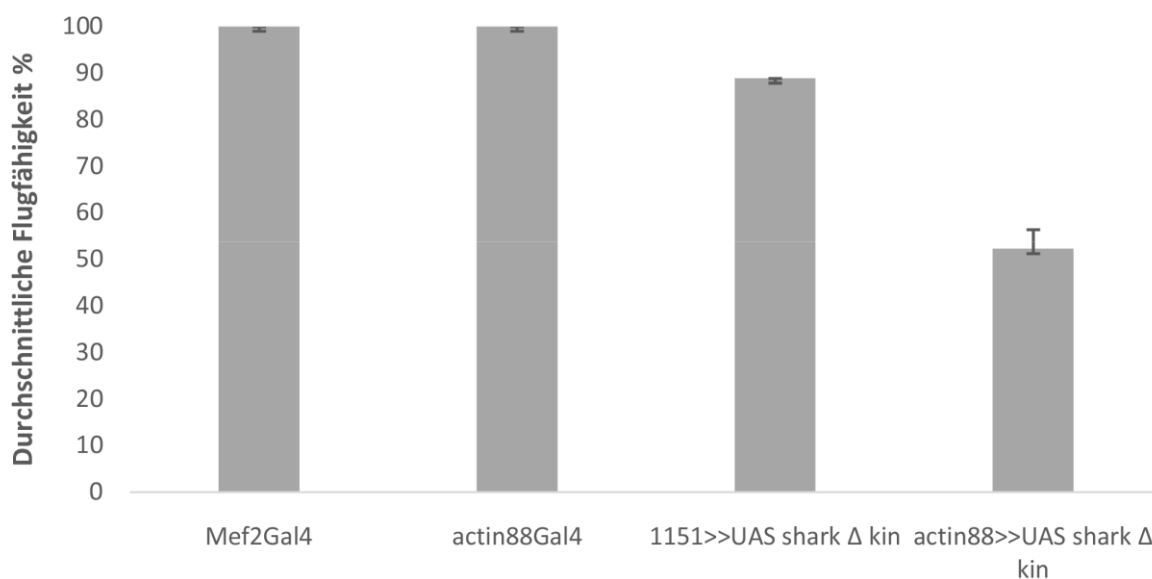


**Abb. 23:** Die Expression von *UAS-shark  $\Delta$  kin mcherry* mittels actin88Gal4 scheint die interfilamentäre Verbindung zu beeinflussen. Die adulte Flugmuskulatur wurde mittels Phalloidin und DAPI gefärbt um das Aktinzytoskelett und die Zellkerne zu visualisieren. Anterior links, posterior rechts. Die DLM der homozygoten 1151Gal4 Linie (B, C) weist im Vergleich zum Wildtyp (A) keinen Defekt auf. Die homozygote Actin88Gal4 Linie, zeigt sowohl in der Übersicht (D) als auch auf Aktinfilamentebene (E, Pfeil) eine Akkumulation von Aktin. Die Expression von *1151Gal4>>UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry* hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der DLM.



In *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen konnte ein Defekt im Alignment der Aktinfilamente beobachtet werden (H, Pfeil).

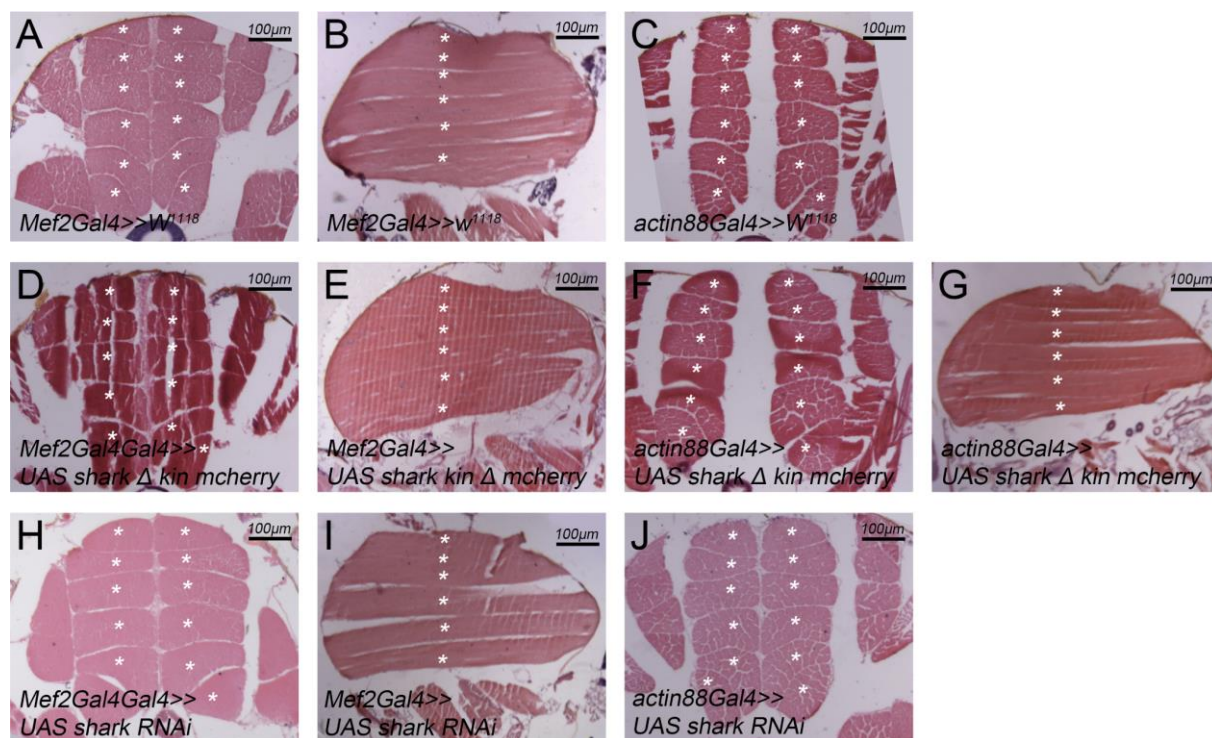
Eine statistische Auswertung des durchschnittlichen Flugverhaltens der *1151Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen zeigen im Vergleich zu den heterozygoten *Mef2-Gal4; W<sup>1118</sup>* und *Actin88Gal4; W<sup>1118</sup>* eine Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit um 12% und 49% (Abb. 24).



**Abb. 24: Die durchschnittliche Flugfähigkeit in *1151Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen ist beeinträchtigt.** Heterozygote *Mef2-Gal4; W<sup>1118</sup>* und *actin88Gal4; W<sup>1118</sup>* Fliegen dienen als Wildtypkontrolle. Fliegen beider Gruppen sind zu 100% in der Lage zu fliegen. Eine Auswertung von *1151Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen zeigt im Vergleich zu den Wildtypkontrollen eine Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit um 12% und 49% an.

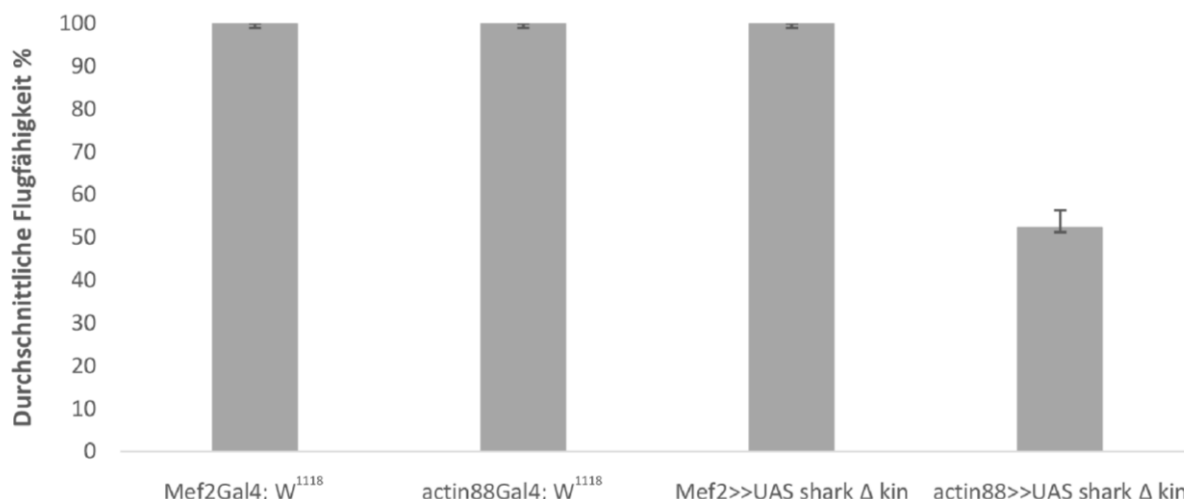
In Kooperation mit der Arbeitsgruppen von Dr. Halyana Shcherbata (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) wurden longitudinale und transversalen Paraffinschnitte von adulten transgenen Fliegen durchgeführt. Basierend auf dem Protokoll wurden weitere transgene Linien getestet, sowie mehrere Wiederholungen durchgeführt (Kucherenko et al. 2010). Die angefertigten longitudinalen und transversen Schnitte der IFM wurden mit Hämatoxylin und

Eosin Y gegengefärbt um das Zytoplasma und die Zellkerne der Muskulatur zu visualisieren. Zu beachten ist, dass Längsrissse der Muskulatur einzelner Proben auf den Prozess des Schneidens zurück zu führen sind und keinen Phänotyp darstellen. *UAS-shark Δ kin-mcherry* sowie *shark-RNAi* wurden mit Hilfe von Mef2-Gal4 und Actin88Gal4 muskelspezifisch exprimiert. Als Kontrollen wurden die gegen den Wildtyp gekreuzten Treiberlinien verwendet (Abb. 25A-C). In *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen konnte kein Defekt in der Entwicklung der DLM beobachtet werden (Abb. 25D-G). Es kommt zu keiner Veränderung in der Anzahl der DLM (Sternchen) und es sind keine degenerativen Bereiche innerhalb der einzelnen Muskeln zu erkennen. Allerdings konnte auch hier ein Defekt im Zusammenhalt der Muskelfasern in den *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen beobachtet werden (Abb. 25G, Pfeil). Eine muskelspezifische Runterregulierung von Shark über *shark-RNAi* exprimiert mittels Mef2-Gal4 und actin88Gal4 führt zu keiner Beeinträchtigung in der Formation der DLM (Abb. 25H-J).



**Abb. 25: Longitudinal und transversalen Schnitte an Actin88Gal4 getriebenen *UAS-shark Δ kin mcherry* bestätigen einen Defekt in dem interfilamentären Zusammenhalt.** Es wurden transversale und longitudinale Paraffinschnitte an der adulten Flugmuskulatur durchgeführt und diese mittels Hämatoxylin und Eosin Y gefärbt um das Zytoplasma und die Zellkerne zu visualisieren. Anterior links, posterior rechts. Die DLM der heterozygoten *Mef2-Gal4* Linie (A, B) und *Actin88Gal4* Linie (C) weisen keinen Defekt auf. Die Expression von *Mef-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der DLM (D, E). *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen weisen einen Defekt im Aufbau der Aktinfilamente auf (F, G, Pfeil). Eine Runterregulierung der *shark* mRNA mittels RNAi, exprimiert mit *Mef2-Gal4* (H) und *Actin88Gal4* (J) führt zu keinem Defekt in der Entwicklung der DLM.

Eine statistische Auswertung des durchschnittlichen Flugverhaltens der Fliegen, welche *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimieren, zeigt eine Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit um 50%. Dies konnte in *Mef2Gal4* exprimierten Fliegen nicht beobachtet werden, diese weisen eine mit dem Wildtyp vergleichbare durchschnittliche Flugfähigkeit auf (Abb. 26).



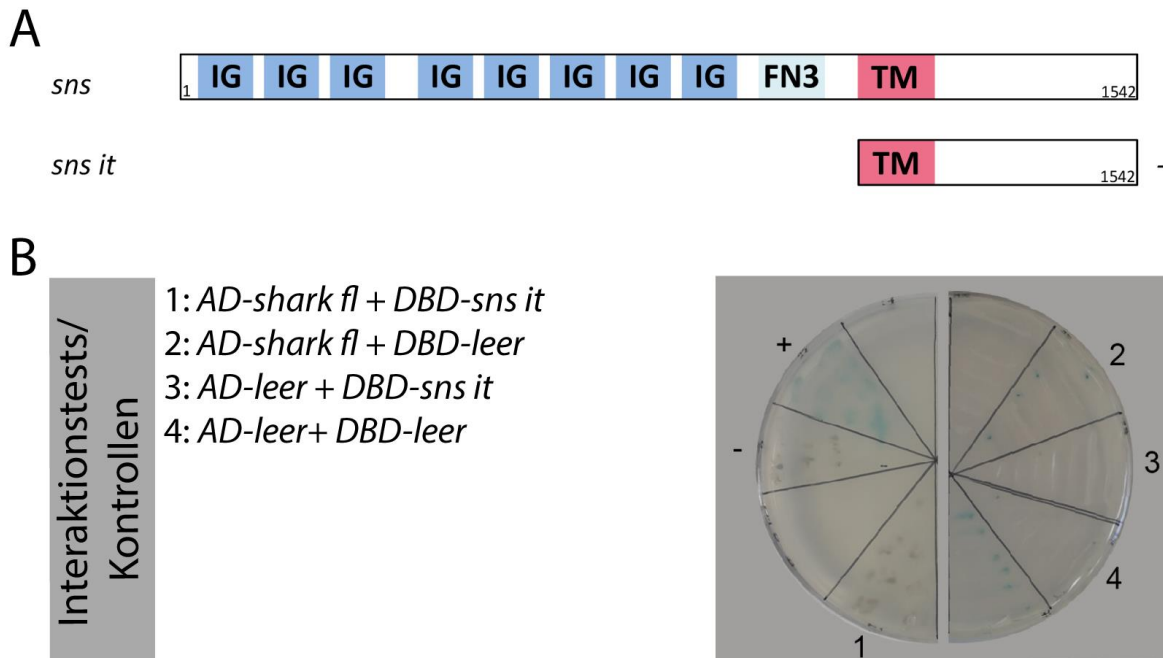
**Abb. 26: Die durchschnittliche Flugfähigkeit in *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* getriebenen Fliegen ist beeinträchtigt.** Heterozygote *Mef2-Gal4; W<sup>1118</sup>* und *actin88; W<sup>1118</sup>* Fliegen dienen als Wildtypkontrolle. Fliegen beider Gruppen sind zu 100% in der Lage zu fliegen. Eine Analyse von *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimierenden Tieren zeigt eine Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit um 50%, nicht jedoch in *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimierenden Tieren.

Die muskelspezifische Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* sowie die muskelspezifische Runterregulierung von Shark mittel RNAi, scheint keinen starken Einfluss auf die Bildung der DLM zu haben, da es zur Ausbildung der korrekten Anzahl der DLM kommt. Wobei die Expression von *shark-RNAi* im Vergleich zu *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* zu etwas dünneren Muskeln führt. Um dies näher zu charakterisieren könnte eine Kernzählung näher Aufschluss geben. Eine Übersicht über den Fusionsprozess während der Pupalentwicklung, sowie die Analyse weitere Deletionen von Shark, welche im Embryo einen Phänotyp gezeigt haben (*UAS-shark Δ Ank* und *UAS-shark Δ 2SH2*) könnte weitere Einblicke in die Funktion von Shark liefern. Auch wäre es sehr interessant der Lokalisation von Shark und der Shark Konstrukte folgen zu können. Hier könnte zum einen eine statistische Auswertung von Puppen-Präparationen 24h APF helfen um eine Aussage über den Fusionsprozess treffen zu können, zum anderen *life imaging* dieser, ebenfalls während des Fusionsprozesses.

### 3.6 Zwischen Shark und Sns besteht eine genetische Interaktion

Die während dieser Arbeit durchgeführte Expressionsstudien mit Shark-Deletionen deutet darauf hin, dass Shark eine Rolle bei der Myoblastenfusion spielt. Genetische Interaktionen sollen darüber endgültig Aufschluss geben. Die Etablierung einer *shark*<sup>1</sup>, *blow*<sup>2</sup>-Doppelmutante war nicht möglich, da eine Rekombination von *shark*<sup>1</sup> und *blow*<sup>2</sup> nicht erfolgreich war.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Tyrosinresten von an der Myoblastenfusion beteiligten Proteinen essentiell für die Signalweiterleitung während des Fusionsprozesses ist. So führt zum Beispiel ein Austausch der Phosphorylierungsstelle Y378 in Blow zu einem Verlust der Interaktion zwischen Blow und Crk. Auch ist eine Rettung des *blow* Fusionsphänotyps nur mit dem Wildtyp *UAS-blow fl* nicht jedoch mit *UAS-blowY378F* möglich (Jin et al. 2011). In der intrazellulären Domäne aller an der Myoblastenfusion beteiligten IgSFs befinden sich Tyrosine, welche während des Fusionsprozesses phosphoryliert werden (Bulchand et al. 2010; Kaipa et al. 2013; Kocherlakota et al. 2008). Während der BCR Aktivierung an der immunologischen Synapse bindet Syk, das Vertebraten Homolog von Shark, unter anderem an phosphorylierte Tyrosinreste des ITAM, was zu einer Aktivierung von Syk führt (Mocsai et al. 2010). Basierend darauf wurde zunächst untersucht, ob zwischen Shark und Sns eine direkte Proteininteraktion vorliegt. In *Drosophila* ist noch unbekannt wie Shark während der Myoblastenfusion reguliert wird. Daher wurde zunächst untersucht, ob zwischen Shark und Sns eine direkte Proteininteraktion vorliegt. Dafür wurde der offene Leserahmen von *sns* ohne seine extrazelluläre-Domäne und *shark* (*shark fl* Konstrukt: Masterarbeit Fritzen 2013) in die Hefe-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert und diese in Hefe Co-exprimiert. Ein Transport von Transmembranproteinen in den Nukleus findet stark reduziert statt, weshalb es zu einer Verfälschung des Interaktionstestes hätte kommen können. In Abb. 27A ist eine Übersicht der Proteinstruktur von Sns fl und Sns it dargestellt. Eine Co-Expression von *sns it pGBKT7* und *shark fl pGADT7* ließ keine Aktivierung der Reportergene erkennen und weist darauf hin, dass in Hefen keine Interaktion zwischen Sns und Shark besteht (Abb. 27B1). Alle Kontrollen zeigen keine Selbstinduktion der Reportergene (Abb. 27B2-4).

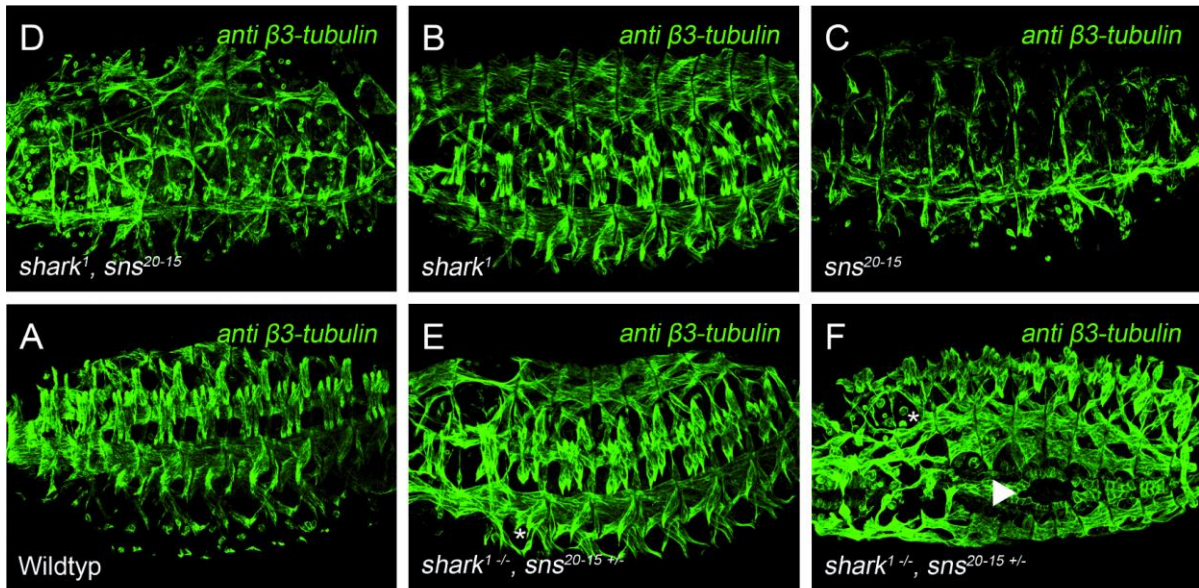


**Abb. 27: Zwischen Shark und Sns konnte keine Protein-Protein Interaktion festgestellt werden.** In A ist eine Übersicht des verwendeten *sns it pGBKT7* Konstruktes dargestellt. Mit einem (-) ist die Interaktion der Shark-Deletionskonstrukts mit den Sns-Deletionskonstrukten gekennzeichnet. Es konnte keine Interaktion zwischen *shark fl pGADT7* und den *sns it pGBKT7* festgestellt werden (B1). Tests auf Autoinduktion (B2-4) sind negativ gewesen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu *in vitro* Daten eines bimolecular-flourescence-complementation-assay (BiFC). Dort konnte bereits gezeigt werden, dass es bei einer Co-Expression von *shark fl NYFP* und *sns it CYFP* in SL2 Zellen zu einer Komplementierung des YFP Signals kommt, was auf eine Interaktion zwischen Shark und Sns it hindeutet (Dissertation Freitag 2013). Da eine Interaktion zwischen Shark und Sns vermutlich auf eine Phosphorylierung von Sns oder Shark beruht, ähnlich wie dies für Syk gezeigt werden konnte, könnte dies auf eine fehlende Phosphorylierung der Thyrosinreste von Shark oder Sns hinweisen. Der Nachweis von Proteininteraktionen basierend auf dem Hefe-2-Hybrid System, kann zu falsch negativen Interaktion führen, falls die Interaktion auf posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen beruht, da diese häufig nicht in Hefe stattfinden (Bruckner et al. 2009). Die Frage ob eine Interaktion eine vorherige Phosphorylierung von Sns oder Shark voraussetzt und ob Shark zu den Kinasen gehört, welche Sns phosphorylieren, bleibt vorerst ungeklärt.

Eine direkte Proteininteraktion zwischen Shark und Sns konnte bis jetzt nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Shark und Sns eine Doppelmutante generiert, sowie Dosisexperimente durchgeführt und mit dem Wildtyp, sowie den Einzelmutanten *shark*<sup>1</sup> und *sns*<sup>20-15</sup>, einem hypomorphen Allel von Sns, verglichen. *shark*<sup>1</sup>-Mutanten weisen keinen Defekt während der Entwicklung der Muskulatur auf (Abb. 28B). *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten weisen einen Aminosäureaustausch in der intrazellulären Domäne von *sns* auf (Kocherlakota et al. 2008). Das führt zu einem starken Fusionsdefekt, bei dem nur noch vereinzelt Fusionen stattfinden und es zur Bildung von mini-Muskeln kommt (Abb. 28C). *shark*<sup>1</sup>, *sns*<sup>20-15</sup>-Doppelmutanten bilden im Vergleich zur *sns*<sup>20-15</sup>-Einzelmutante mehr laterale Muskeln aus, und zeigen damit einen weniger starken Fusionsdefekt (Abb. 28C, D, Pfeile). Entfernt man aus den homozygoten *shark*<sup>1</sup>, *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten eine Kopie von *sns*<sup>20-15</sup> führt dies zu einer starken Verbesserung des Fusionsdefektes (Abb. 28E,F). Die meisten dieser Embryonen weisen mehr unfusionierte FCM auf, als dies in *shark*<sup>1</sup>-Mutanten oder im Wildtyp zu beobachten ist (Abb. 28E, Sternchen). Einige Embryonen dagegen zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl an unfusionierten FCM (Abb. 28F, Sternchen). In allen Embryonen konnte ein Dorsalschlussdefekt beobachtet werden (Abb. 28F, Pfeilkopf).





**Abb. 28: Shark scheint genetisch mit Sns zu interagieren.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta 3$ -Tubulins sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A).  $sns^{20-15}$ -Mutanten (C) weisen im Gegensatz zu  $shark^1$ -Mutanten (B) einen starken Fusionsdefekt auf (C).  $shark^1$ ,  $sns^{20-15}$ -Doppelmutanten zeigen einen schwächeren Fusionsdefekt als  $sns^{20-15}$ -Einzelmutanten (D). Die Herausnahme einer Kopie  $sns^{20-15}$  aus  $shark^1$ ,  $sns^{20-15}$ -Doppelmutanten führt zu einem leichten Fusionsdefekt mit einigen unfusionierten FCM (E, F Sternchen), sowie zu dem bei  $shark^1$ -Mutanten charakteristischen Dorsalschlussdefekt (F, Pfeilkopf).

Die Analyse von  $shark^1$ ,  $sns^{20-15}$ -Doppelmutanten zeigt möglicherweise eine leichte Verbesserung des  $sns^{20-15}$  induzierten starken Fusionsdefektes, welche mittels Kernzählungen verifiziert werden muss. Die Herausnahme einer Kopie von  $sns^{20-15}$  aus der Doppelmutante führt nicht zu einer mit  $shark^1$ -Mutanten vergleichbaren funktionellen Myoblastenfusion. Die Analyse von  $shark^1$ ,  $sns^{20-15}$ -Doppelmutanten, sowie die Herausnahme einer Kopie von  $sns^{20-15}$  aus der Doppelmutante weist somit auf eine genetische Interaktion zwischen Shark und Sns während der Myoblastenfusion hin. Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass Shark in *Dswip-1* und  $sns^{20-15}$ -Mutanten nicht mehr korrekt am Zellkontakt lokalisiert und Shark *in vitro* in der Lage ist mit DSwip-1 zu interagieren (Dissertation Freitag 2013). Dies zusammen mit den hier gezeigten Daten unterstützt ein Modell in dem Shark zusammen mit Sns und Swip am Zellkontakt eine Funktion einnimmt (Dissertation Freitag 2013). Ob Shark dabei, ähnlich wie dies für Vertebraten gezeigt werden konnte, ebenfalls von DSwip-1 zum Zellkontakt rekrutiert wird und dort möglicherweise die (Teil-) Phosphorylierung von Sns übernimmt oder es durch die Bindung an



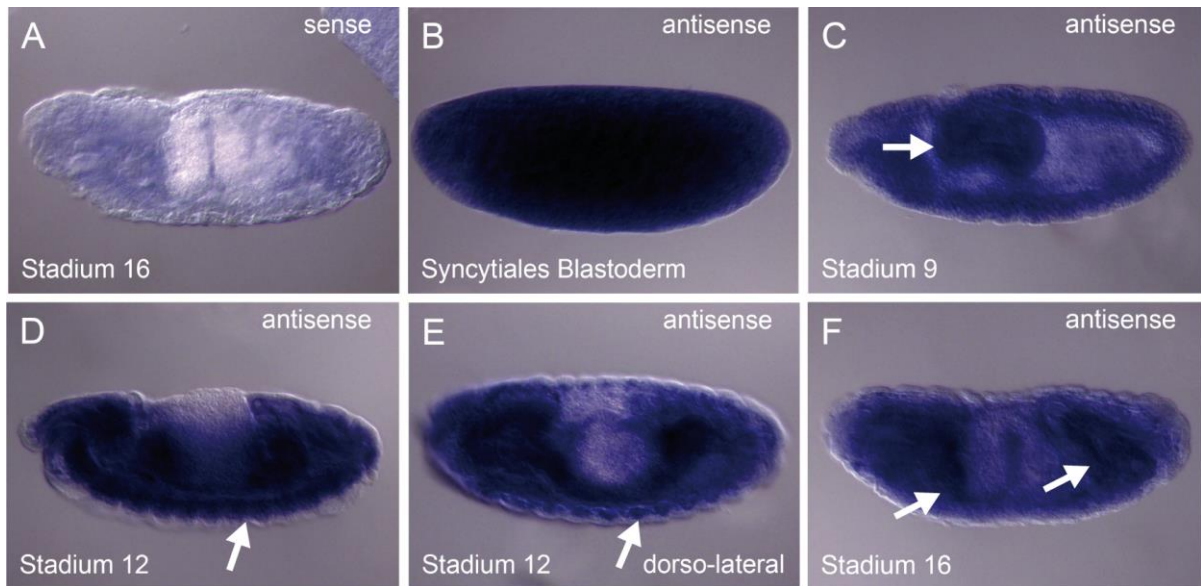
bereits (Teil-) phosphorylierten Sns aktiviert wird und weiteres Downstream Signaling aktiviert, kann allerdings noch nicht gesagt werden (Krocze et al. 2010; Rolli et al. 2002; Wienands et al. 1998). Die Daten zur *shark<sup>1</sup>*, *sns<sup>20-15</sup>*-Doppelmutante sowie des Dosisexperimentes müssen zudem durch Kernzählungen einzelner Muskeln dieser Mutanten verifiziert werden.

### **3.7 Der potentielle Blow Interaktionspartner Drp1 scheint an der Myoblastenfusion beteiligt zu sein**

#### **3.7.1 Die GTPase Domäne von Drp1 scheint essentiell für die Vermittlung der Interaktion mit Blow zu sein**

Interessanterweise wurde durch einen Hefe-2-Hybridscreen das mitochondriale Regulatorprotein Drp1 als potentieller Blow Interaktionspartner identifiziert (Masterarbeit M. Papendieken 2013). Im zweiten Teil dieser Arbeit wird im Folgenden die Beziehung zwischen Blow und Drp1 sowie deren biochemische Interaktion weiter charakterisiert und untersucht inwieweit Mitochondrien während des Fusionsprozesses eine Rolle spielen. Die während der Myoblastenfusion etablierte Kommunikationsstruktur FuRMAS weist vergleichbare Elemente mit der immunologischen Synapse auf (IS), welche zwischen einer T-Zelle und einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) etabliert wird (Dustin et al. 1998; Grakoui et al. 1999; Kesper et al. 2007; Monks et al. 1998; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Bei beiden Strukturen handelt es sich um lokal begrenzte transiente Adhäsionsstrukturen, bei denen es nach erfolgreicher Zellerkennung und -adhäsion zu einer dramatischen Reorganisation von F-Aktin, sowie zu einer Rekrutierung weiterer Signalproteine Richtung Zellkontakt kommt. Des Weiteren erfolgt an der IS eine Relokalisation von Mitochondrien Richtung Zellkontakt, wo sie die lokale Calcium Konzentration reduzieren und so eine weitere Aktivierung von nachgeschalteten Signalen zu erlauben (Kummerow et al. 2009; Quintana et al. 2007). Da die Relokalisation von Mitochondrien Drp1 abhängig ist, ist die Analyse von Drp1 während der Myoblastenfusion interessant. Drp1 ist ein zytoplasmatisches Protein, welches zu Mitochondrien rekrutiert wird um deren Teilung zu regulieren (Ingeman et al. 2005; Smirnova et al. 1998; Smirnova et al. 2001; Yoon et al. 2001). Während der mitochondrialen Teilung wird das, als Oligomer vorliegende Drp1, zur äußeren mitochondrialen Membran (MOM) rekrutiert, wo es sogenannte Teilungs-Foci ausbildet. Diese fallen teilweise

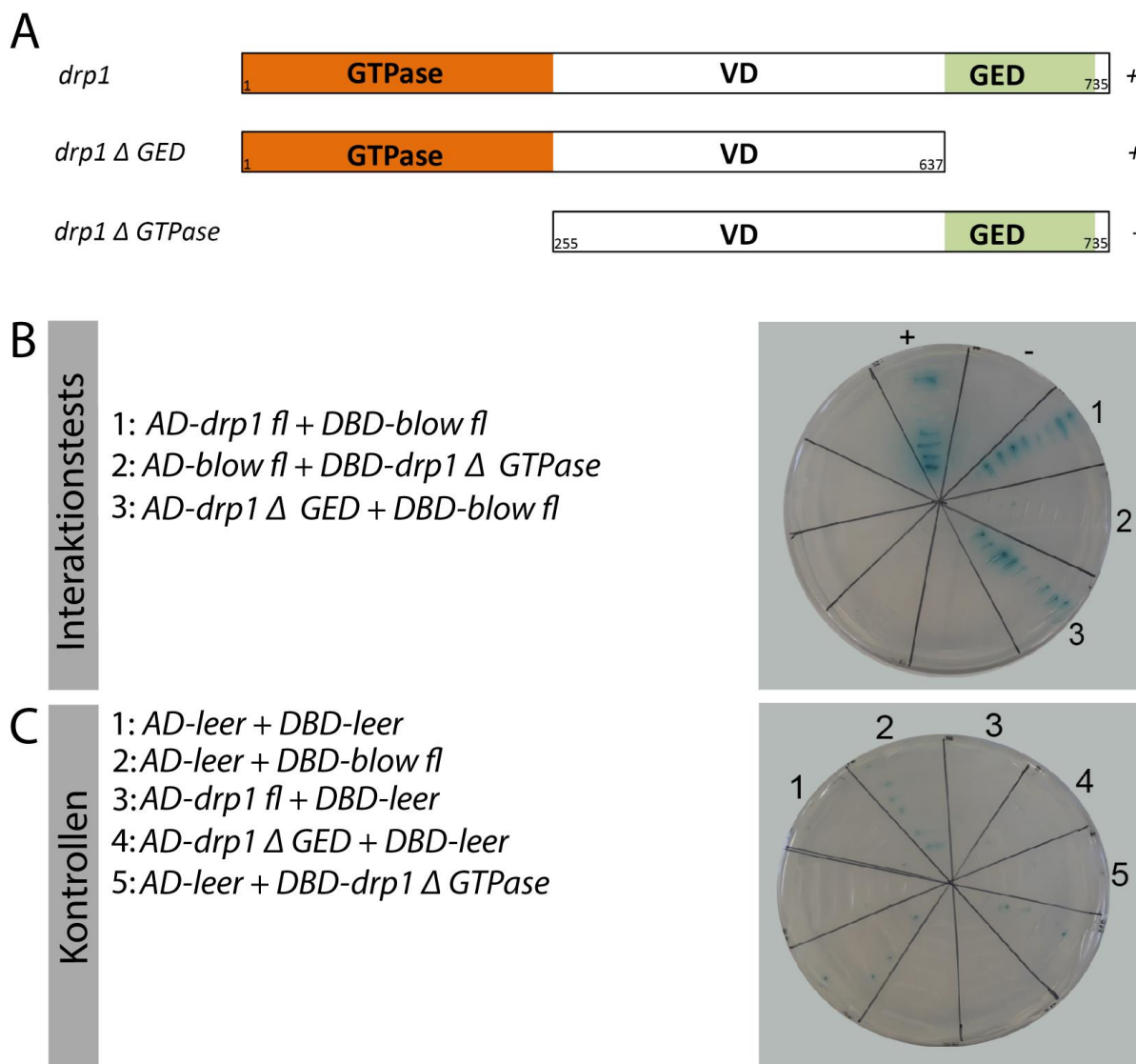
mit bereits durch Tubuli begrenzte Bereiche von Mitochondrien zusammen (Ingberman et al. 2005; Yoon et al. 2001). Es wird vermutet, dass die Bindung von Drp1 an MOM Rezeptoren einen essentiellen Schritt in der Einleitung der mitochondrialen Teilung darstellt (Otera und Mihara 2011; Otera und Mihara 2011). Um zunächst zu bestimmen, ob die mRNA von Drp1 während der Embryogenese von *Drosophila* während der Fusion vorhanden ist, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer *drp1* RNA Sonde durchgeführt. Dafür wurde eine etwa 600bp lange sense und antisense Sonde von *drp1* erstellt. Als Kontrolle dienen Embryonen, welche mit der *drp1* sense Sonde hybridisiert wurden. Da die Sequenz der sense Sonde der *drp1* mRNA entspricht sollte es hier zu keiner spezifischen Hybridisierung kommen. Für die Hybridisierung mit der sense Sonde konnte lediglich ein leichtes Hintergrundsignal festgestellt werden (Abb. 29A). Während des syncytialen Blastoderms liegt die *drp1* mRNA stark maternal verteilt vor (Abb. 29B). In den Stadien 9-16 liegt die *drp1* mRNA größtenteils ubiquitär verteilt vor (Abb. 29C-F). In Stadium 9 erkennt man ein stärkeres Signal der *drp1* mRNA in dem invaginierenden Darmprimordium (Sternchen) sowie im Keimstreif (Abb. 29C, Pfeil). Ab Stadium 12 wird ein stärkeres Signal im visceralen Mesoderm (Sternchen) und im ZNS sichtbar (Abb. 29D, Pfeil). In der dorso-lateralen Ansicht eines Stadium 12 Embryos zeigt sich außerdem ein stärkeres Signal in der sich entwickelnden Muskulatur (Abb. 29E, Pfeile). Während des Stadiums 16 ist dagegen nur noch eine stärkere Expression in den anterioren und posterioren Bereich des Darms zu beobachten (Abb. 29F, Pfeile). Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die *drp1* mRNA während der Fusionsrelevanten Stadien vorhanden ist.



**Abb. 29: *drp1* in situ Hybridisierung zeigt eine maternale Komponente, sowie eine ubiquitäre Expression.** *In situ* Hybridisierung an *whole mount* Wildtyp Embryonen mit Hilfe einer RNA antisense Sonden gegen *drp1*. Anterior links, posterior rechts. (A) Sense Sonde eines Stadium 16 Embryos zeigt keine Nachweis von mRNA. Eine starke Expression im syncytialen Blastoderm weist auf eine maternale Komponente hin (B). Im Stadium 9 (C) ist eine Expression im visceralen Mesoderm (Pfeil) und im Stadium 12 zusätzlich im ZNS (Pfeil) zu beobachten (D). Eine dorso-laterale Ansicht zeigt ein Nachweis auch in der sich entwickelnden Muskulatur (E, Pfeil). Im Stadium 16 bleibt die Expression im visceralen Mesoderm bestehen (F, Pfeil). Während aller Stadien ist eine ubiquitäre Expression zu beobachten.

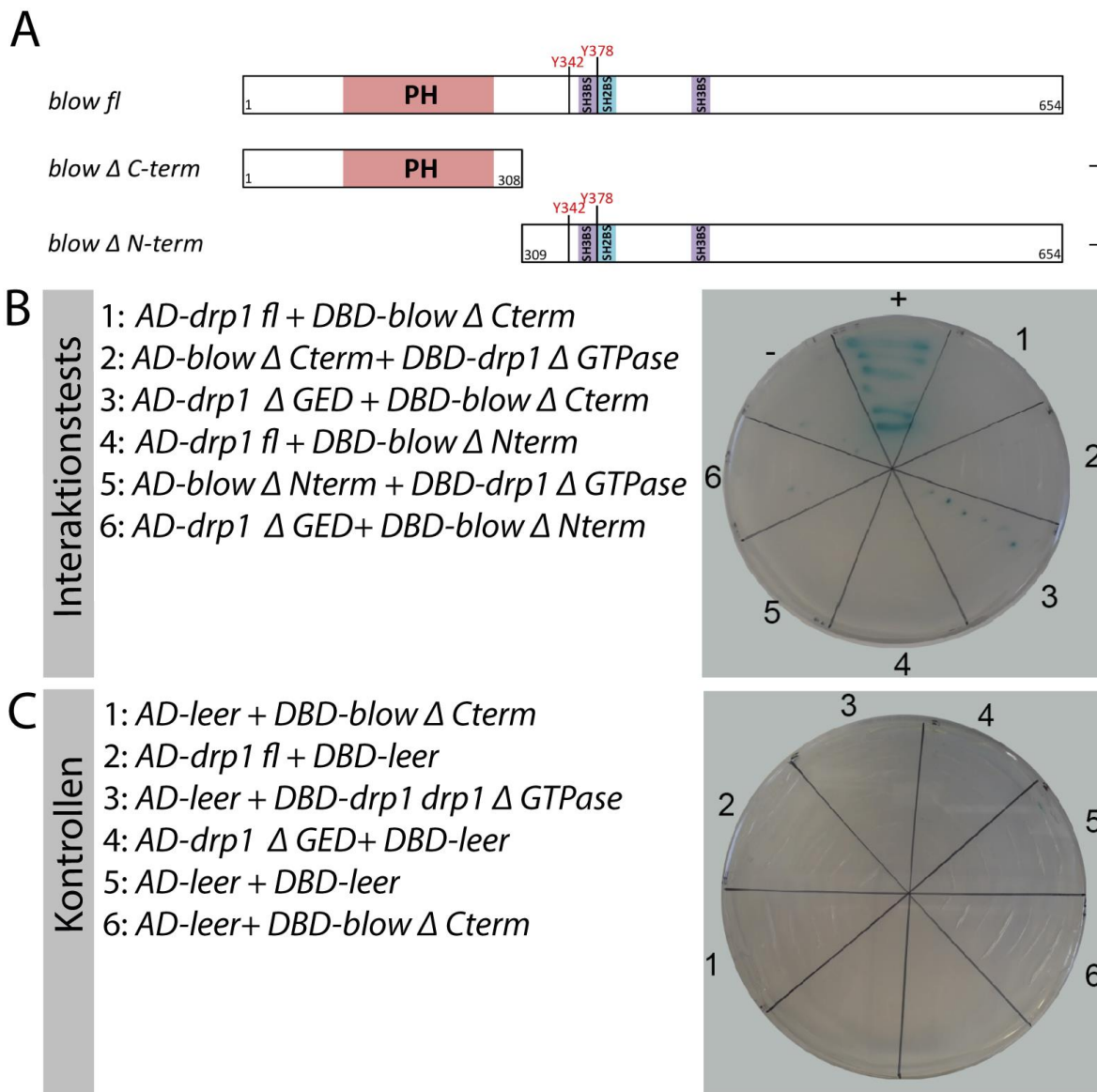
Als nächstes wurde die Interaktion zwischen Drp1 und Blow mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems bestätigt. Dafür wurde der gesamte verfügbare offene Leserahmen von *blow* und *drp1* in die Hefe-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert und diese in Hefe Co-exprimiert. Wachstum und Blaufärbung der transformierten Hefe bestätigte die Interaktion zwischen Blow und Drp1 (Abb. 30B1). Mit Hilfe von Drp1-Deletionskonstrukten sollte der Bereich der Interaktion zwischen Drp1 und Blow näher eingegrenzt werden. Dafür wurde zum einen ein Konstrukt kloniert, welchem die GTPase-Domäne und zum anderen ein Konstrukt welchem die GED-Domäne fehlt (Abb. 30A). Drp1  $\Delta$  GED pGADT7 und Drp1  $\Delta$  GTPase pGADT7 wurden jeweils zusammen mit Blow in Hefen Co-exprimiert. Drp1  $\Delta$  GED ist weiterhin ausreichend um eine Interaktion zwischen Blow und Drp1 zu vermitteln (Abb. 30B3). Bei einer Co-Expression von *drp1*  $\Delta$  GTPase pGADT7 und *blow fl* pGBKT7 konnte jedoch keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (Abb. 30B2). Dies deutet darauf hin, dass die GTPase-Domäne von Drp1 essentiell für eine Interaktion zwischen Blow und Drp1 ist. Alle Kontrollen Co-exprimiert mit

den entsprechenden Leervektoren zeigten keine Autoinduktion des Hefe-2-Hybrid Systems (Abb. 30C).



**Abb. 30: Die GTPase-Domäne von Drp1 scheint für die Interaktion mit Blow essentiell zu sein.** Eine schematische Übersicht aller generierten Drp1-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit *blow fl pGBKT7* sind in A dargestellt. Proteinstruktur von Drp1: variable Domäne (VD). Mit einem (+ oder -) ist eine festgestellte oder nicht festgestellte Interaktion der Drp1-Deletionskonstrukts mit Blow gekennzeichnet. Es konnte eine Interaktion zwischen *drp1 fl pGADT7*, *drp1 Δ GED pGADT7* und *blow fl pGBKT7* (B1, 3) nicht jedoch zwischen *blow fl pGBKT7* und *drp1 Δ GTPase pGADT7* (B2) festgestellt werden. Alle Tests auf Autoinduktion (C1-5) sind negativ ausgefallen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.

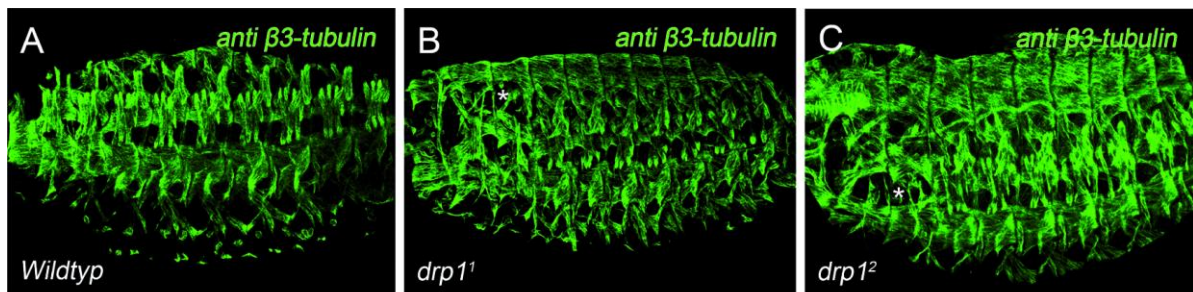
Die Frage welcher Bereich von Blow essentiell für die Vermittlung einer Interaktion zwischen Blow und Drp1 ist wird als nächstes untersucht. Um die Frage zu beantworten wurden zwei Deletionskonstrukte von *blow* erstellt. Eines, dem der N-terminale Bereich fehlt in dem sich die PH-Domäne von Blow befindet und ein weiteres, dem der C-terminale Bereich, welcher beide SH2-BS und die SH3-BS enthält (Übersicht, Abb. 31A). Beide Deletionskonstrukte wurden jeweils mit Drp1 Co-exprimiert. Es konnte weder für das Fusionsprotein Blow  $\Delta$  N-term noch für Blow  $\Delta$  C-term eine Interaktion mit Drp1 festgestellt werden (Abb. 31 B1,4 noch 31D). Auch bei der Co-Expression von *blow  $\Delta$  N-term pGBKT7/pGADT7* und *blow  $\Delta$  C-term pGBKT7/pGADT7* zusammen mit *drp1  $\Delta$  GTPasepGBKT7* und *drp1  $\Delta$  GED pGADT7* konnte wie erwartet keine Interaktion festgestellt werden (Abb. 31 B2-3,5-6). Die Co-Expression aller Konstrukte zusammen mit den entsprechenden Leervektoren zeigt keine Autoinduktion des Hefe-2-Hybrid Systems (Abb. 31C). Für eine Protein-Protein Interaktion zwischen Blow und Drp1 ist auf der Seite von Drp1 die GTPase-Domäne essentiell und auf der Seite von Blow scheint das vollständige Protein benötigt zu werden.



**Abb. 31: Weder der N-terminale noch der C-terminale Bereich sind in der Lage die Interaktion mit Drp1 zu vermitteln.** Eine schematische Übersicht aller generierten Blow-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit Blow-Deletionskonstrukten und Drp1-Deletionskonstrukten sind in A dargestellt. Mit einem (-) ist eine Interaktion der Blow-Deletionskonstrukte mit den Drp1-Deletionskonstrukten gekennzeichnet. Es konnte keine Interaktion zwischen *drp1 fl* pGADT7, *drp1 Δ GTPase* pGBKT7 und *drp1 Δ GED* pGADT7 und *blow Δ C-term* pGBKT7/pGADT7 und *blow Δ N-term* pGBKT7/pGADT7 (B1-6) festgestellt werden. Alle Tests auf Autoinduktion (C1-6) sind negativ ausgefallen. Positiv- und Negativkontrolle sind mit einem (+) und (-) dargestellt.

### 3.7.2 Zwischen Blow und Drp1 scheint auch eine genetische Interaktion vorzuliegen

Dynamine und Dynamin-ähnliche Proteine sind in einer Vielzahl von Teilungsevents von Vesikeln und ihrem Zellkompartiment oder –Membran und Organellen, einschließlich Clathrin-coated Vesikeln, Phagosomen und Mitochondrien beteiligt. Sie gehören zur Gruppe der großen GTPasen und besitzen alle eine GTPase Domäne, eine middledomain (MD) und GTP Domäne (Praefcke und McMahon 2004). Drp1 gehört zur Gruppe der Dynamin 1-like Gruppe (DNM1L) und wurde aus diesem Grund zusammen mit Shibire bereits auf eine Funktion während der Myoblastenfusion hin untersucht (Masterarbeit Braukmann, 2012). Dabei wurde eine zu diesem Zeitpunkt nicht näher charakterisierte *drp1*-Mutante untersucht, welche einen leichten Fusionsdefekt zeigte. Hier soll nun untersucht werden, ob verschiedene *drp1*-Mutanten die Myoblastenfusion beeinträchtigen. Dafür wurde zum einen *drp1*<sup>1</sup> und *drp1*<sup>2</sup> verwendet. Beide besitzen eine Punktmutation welche zu einem Abbruch der Proteinsynthese führt. Sowohl homozygote *drp1*<sup>1</sup> als auch *drp1*<sup>2</sup> zeigen beide einen leichten Fusionsdefekt mit wenigen unfusionierten FCM (Abb. 17B-C, Sternchen).

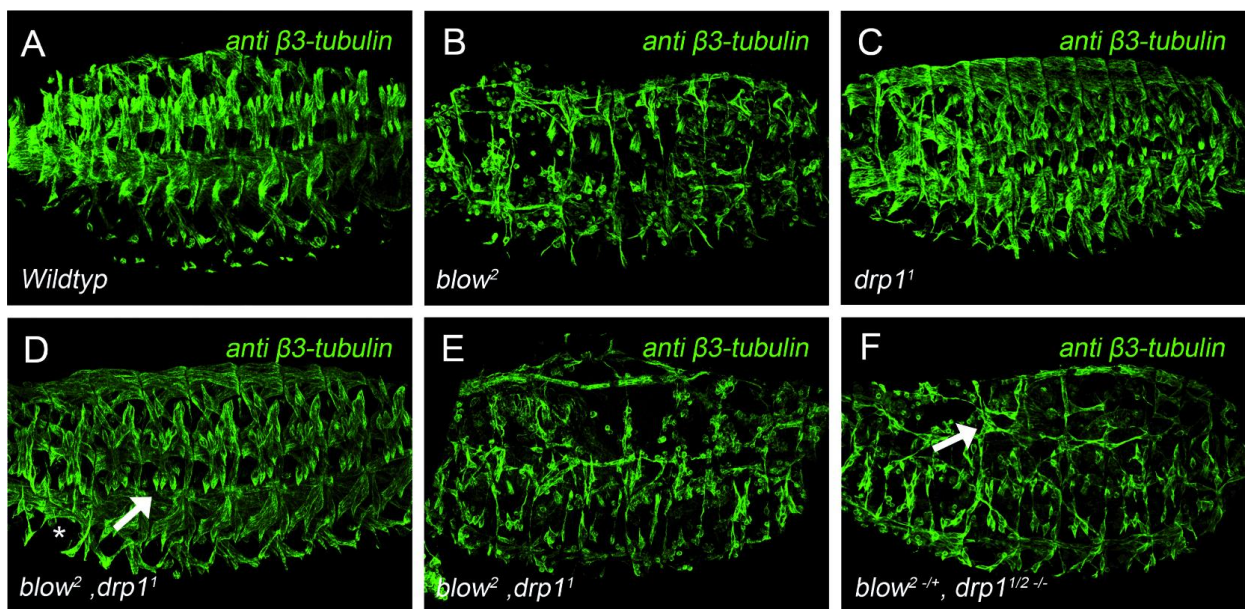


**Abb. 32: *drp1* Mutanten weisen einem leichten Fusionsdefekt auf.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). *drp1*<sup>1</sup>- und *drp1*<sup>2</sup>-Mutanten (B, C) weisen im Vergleich zum Wildtyp einige unfusionierten FCM auf (Sternchen).

Eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen Blow und Drp1 konnte bereits bestätigt werden, die Frage bleibt allerdings noch, ob Blow und Drp1 auch während der Myoblastenfusion zusammen eine Rolle spielen. Um dies zu testen wurden zunächst *blow*<sup>2</sup>, *drp1*<sup>1</sup>-Doppelmutanten etabliert und diese untersucht. Basierend darauf, dass *drp1*<sup>1</sup>-Mutanten lediglich einen sehr leichten Defekt aufweisen, *blow*<sup>2</sup>-Mutanten dagegen einen sehr starken Fusionsdefekt aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass auch *blow*<sup>2</sup>, *drp1*<sup>1</sup>-Doppelmutanten, einen sehr starken



Fusionsdefekt aufweisen. Überraschenderweise ist die Varianz der Phänotypen sehr deutlich. Es sind zum einen Embryonen zu beobachten, welche lediglich einen leichten Fusionsdefekt aufweisen, mit einigen unfusionierten FCM (Sternchen) und keulenförmig ausgeprägten lateralen Muskeln (Abb. 33D, Pfeile). Zum anderen sind Embryonen zu beobachten, welche einen deutlich stärkeren Fusionsdefekt aufweisen, ähnlich dem von *blow<sup>2</sup>*-Mutanten (Abb. 33E, B). Im Folgenden wurde ein Dosisexperiment durchgeführt bei dem die *blow<sup>2</sup>, drp1<sup>1</sup>*-Doppelmutante mit der *drp1<sup>2</sup>*-Mutante verkreuzt wurde. Diese Embryonen sind demnach transheterozygot für *drp1<sup>1</sup>/drp1<sup>2</sup>* und heterozygot für *blow<sup>2</sup>*. Die Herausnahme einer Kopie von *blow<sup>2</sup>* führt zu einem deutlichen Fusionsdefekt, welcher allerdings nicht so stark verläuft wie dies in *blow<sup>2</sup>*-Mutanten der Fall ist. Hier scheinen etwas mehr kleine Muskeln gebildet zu werden als dies in *blow<sup>2</sup>*-Mutanten oder einem Teil der *blow<sup>2</sup>, drp1<sup>1</sup>*-Doppelmutante der Fall ist (Abb. 33F, Pfeil).



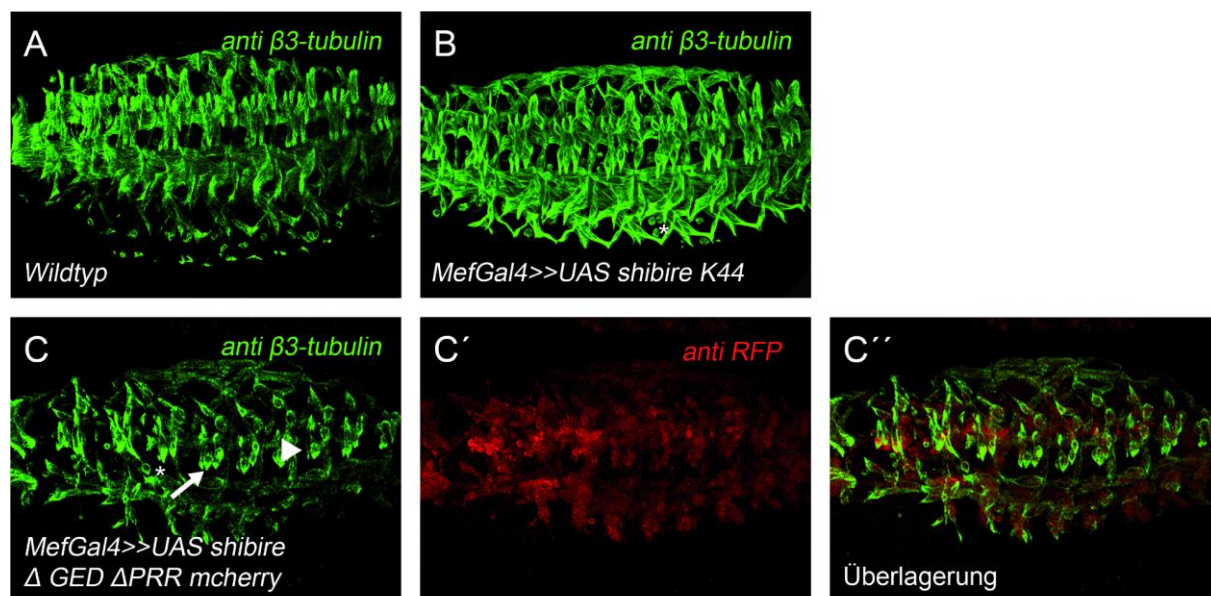
**Abb. 33: Drp1 und Blow scheinen genetisch miteinander zu interagieren.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels das muskelspezifischen  $\beta 3$ -Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). *blow<sup>2</sup>*-Mutanten (B) weisen im Gegensatz zu *drp1<sup>1</sup>*-Mutanten (C) einen Fusionsdefekt auf (C). *blow<sup>2</sup>, drp1<sup>1</sup>*-Doppelmutanten zeigen einen verbesserten Phänotyp als *blow<sup>2</sup>*-Einzelmutanten (D). Sie weisen einige unfusionierte FCM (Sternchen) sowie keulenförmig ausgeprägte laterale Muskeln auf (Pfeil). Die Herausnahme einer Kopie *blow<sup>2</sup>* aus *blow<sup>2</sup>, drp1<sup>1</sup>*-Doppelmutanten führt zu einem Defekt im Vergleich zu *drp1<sup>1</sup>*-Einzelmutanten (F).



Interessant ist, dass ein Teil der *blow<sup>2</sup>, drp1<sup>1</sup>*-Doppelmutante eine Verbesserung des *blow<sup>2</sup>*-Mutanten Phänotyps zeigt. Es sollte noch einmal abgeklärt werden, ob dieser Phänotyp beständig ist oder der eigentliche Phänotyp eher dem von *blow<sup>2</sup>*-Mutanten entspricht. Allerdings zeigt das Dosisexperiment, dass Blow und Drp1 vermutlich nicht nur auf Proteinebene, sondern auch genetisch miteinander während der Myoblastenfusion miteinander interagieren.

### 3.7.3 Der Verlust der GTPase-Domäne von Shibire führt zu einem Defekt in der Formation der Muskulatur

Shibire ist das Ortholog des klassischen Dynamins, wobei Drp1 dem Dynamin-1 like entspricht (DNM1L). Dynamine sind dafür bekannt an zahlreichen Endozytoseprozessen beteiligt zu sein (Ferguson und De Camilli 2012; Praefcke und McMahon 2004). Bekannt ist, dass die Expression eines dominant-negativ wirkenden Shibire Fusionsprotein zu einem Fusionsdefekt führt, welcher jedoch auf eine fehlerhafte Determination von FC und FCMs beruht, da zu viele FC gebildet werden (Dottermusch-Heidel et al. 2012). Bis jetzt ist nicht klar, ob Shibire und Drp1 möglicherweise in Redundanz zueinander während der Myoblastenfusion wirken. Um weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Shibire zu erhalten wurde ein Deletionskonstrukt, welchem sowohl die GTPase-Domäne als auch die Prolin-reiche Region (PRR) fehlt im Vergleich zu einem dominant-negativ wirkenden Shibireprotein, analysiert (*UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry* Dissertation C. Braukmann). Das dominant-negativ wirkende *UAS-shibire-K44A* führt mit *Mef2-Gal4* exprimiert, im Vergleich zum Wildtyp, zu einem leichten Fusionsdefekt mit vereinzelt unfusioniert vorliegenden FCM (Abb. 34A, B Sternchen). *Mef2>>UAS shibire-GED Δ PRR-mcherry* lokalisiert zytoplasmatisch in den Muskeln (Abb. 19C). Die Expression von *Mef2>>UAS shibire-GED Δ PRR-mcherry* führt zu einem deutlich stärkeren Defekt als die Expression von *Mef>>UASshibire-K44A* (Abb. 34C). Neben einigen unfusionierten FCM (Sternchen), erreichen die Muskeln teilweise ihre epidermale Anheftungstelle nicht (Pfeile) und vereinzelt fehlen Muskeln (Pfeilkopf).

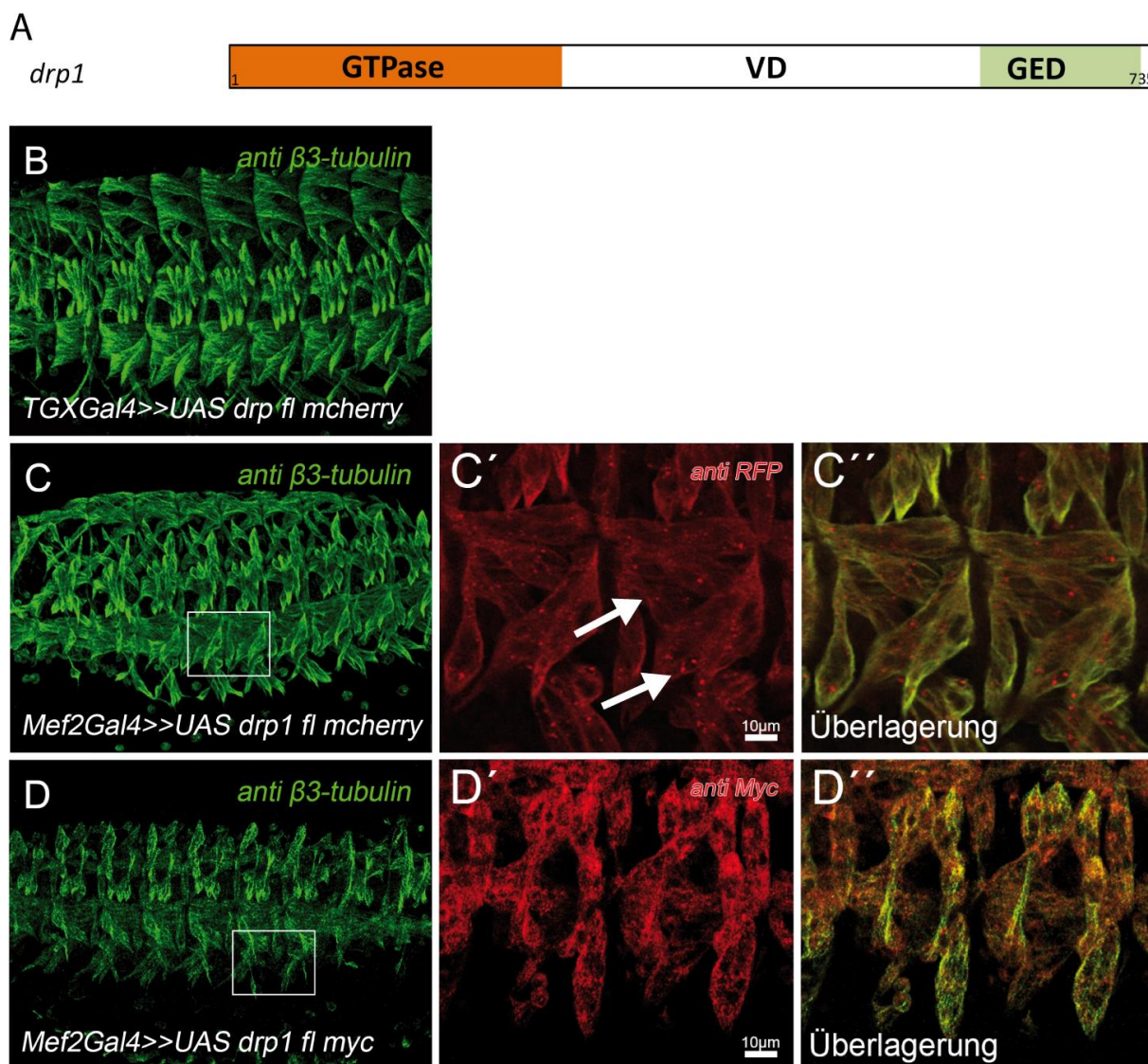


**Abb. 34: Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry* führt zu einem starken Defekt in der Entwicklung der Muskulatur.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels eines muskelspezifischen  $\beta 3$ -Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shibire-K44A* führt zu einigen unfusionierte FCM (B, Sternchen). *Mef2-Gal4>>UAS-shibire -GED Δ PRR-mcherry* getriebene Embryonen weisen einige unfusionierte FCM auf (C, Sternchen), einige Muskeln scheinen ihre epidermale Anheftungsstelle nicht zu erreichen (Pfeil) und es fehlen vereinzelt Muskeln (Pfeilkopf). Ein Antikörpernachweis von mCherry mit anti-RFP zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation von Shibire GED Δ PRR mCherry.

*Mef2-Gal4>>UAS-shibire-K44A* wird aufgrund seiner verminderten Fähigkeit GTP zu binden als Hydrolysemutante betrachtet (van der Blik et al. 1993). Der Phänotyp lässt darauf schließen, dass die Fähigkeit der GTP Hydrolyse eine Rolle während der Fusion spielt. Wird *UAS-shibire-K44A* mit *TGXGal4* exprimiert ist ein deutlich stärkerer Phänotyp zu beobachten (Dottermusch-Heidel et al. 2012). Der Verlust der GED- zusammen mit der Prolin-reichen Region in *Mef2-Gal4>>UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry* führt zu einem deutlich stärkeren Phänotyp, welcher darauf hinweist, dass sowohl die GTPase Aktivität eine Rolle während der Myoblastenfusion spielen könnte.

### 3.7.4 Die Expression von Drp1 während der Myoblastenfusion führt zu leichten Fusionsdefekten

Eine Myoblasten spezifische Expression eines Drp1 fl- sowie Deletionen könnte Rückschlüsse auf die Rolle von Drp1 während der Myoblastenfusion zulassen. Dafür wurden fünf verschiedene Konstrukte erstellt, der offene Leserahmen von Drp1 wurde in einen pUAS-Expressionsvektor mit einem C-terminalen mCherry- oder 10x Myc-Anhang kloniert. Die in *Drosophila* eingebrachten Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe des UAS-Gal4 Systems mit einer Mef2Gal4 und TGXGal4 Treiberlinie Myoblasten-spezifisch im Embryo exprimiert. Im Vergleich zur Mef2Gal Treiber Linie, welche ab Stadium 11-15 exprimiert, startet die Expression von TGXGal4 schon ab Stadium 7-12 (Baylies und Bate 1996; Ranganayakulu et al. 1996). Alle Myoblasten wurden mit anti- $\beta$ 3-Tubulin und der Anhang des Fusionsproteins entweder mit anti-Myc oder anti-RFP sichtbar gemacht. Die Expression von *TGXGal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* führt zu einem leichten Fusionsdefekt, ähnlich zu dem von *drp1<sup>1</sup>* und *drp1<sup>2</sup>* Mutanten (Abb. 35B, Sternchen). *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* (*UAS-drp1-fl-mcherry*, Masterarbeit Braukmann, 2012) exprimierende Embryonen weisen wie erwartet ebenfalls zu einem leichten Fusionsdefekt auf (Abb. 35C, Sternchen). Eine Vergrößerung zeigt, dass Drp1-fl-mcherry teilweise in punktuerte Strukturen akkumuliert auftritt (Abb. 35C, Pfeile). *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* exprimierende Embryonen zeigen zwar einen vergleichbaren Phänotyp zu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* exprimierenden Embryonen, allerdings scheint hier die intrazelluläre Verteilung weniger in punktuerte Strukturen vorzukommen, sondern mehr rein zytoplasmatisch in kleineren Ansammlungen (Abb. 35D, Pfeile).

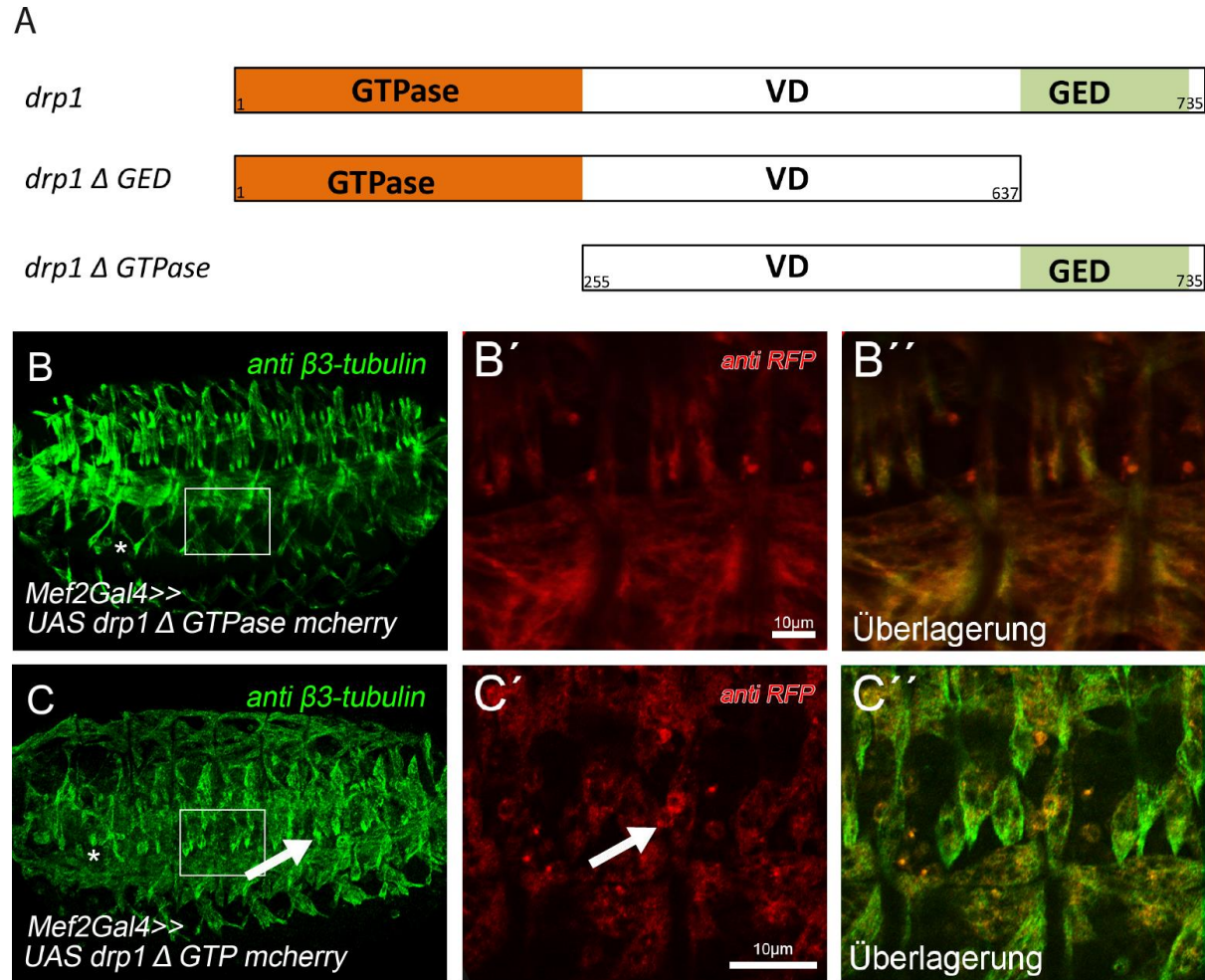


**Abb. 35: Die Expression von *UAS-drp1-fl-mcherry* in Myoblasten führt zu leichten Fusionsdefekten.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. In A ist eine schematische Übersicht der Domänenstruktur von Drp1 dargestellt. *UAS-drp1-fl-mcherry* exprimiert mit TGXGal4 und Mef2Gal4 führt zu einem leichten Fusionsdefekt mit einige unfusionierte FCM (B, C, Sternchen). Ein Antikörperrnachweis des mCherry-Fusionsproteins mittels anti-RFP zeigt eine punktierte zytoplasmatische Lokalisation von Drp1-fl-mCherry (C', C'' Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* exprimierenden Embryonen weisen ebenfalls einen leichten Fusionsdefekt mit vereinzelt unfusionierten FCMs auf (D, Sternchen). Die Lokalisation von Drp1-fl-Myc ist weniger stark punktiert (D', D'').

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Verlust der GTPase- oder der GED-Domäne zu einem Defekt in der Entwicklung während der Myogenese führt. Dafür wurden

*Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* und *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* exprimierende Embryonen untersucht. Eine Übersicht über die Deletionskonstrukte ist in Abb. 36A dargestellt. Durch die Überexpression in *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* getriebenen Embryonen konnte ein zu *drp1<sup>1</sup>*- und *drp1<sup>2</sup>*-Mutanten, sowie Drp1 fl Fusionsprotein induzierten Fusionsdefekt, vergleichbaren Phänotyp beobachtet werden (Abb. 36B). In beiden Fällen ist von einer Verschiebung der Mitochondrien Homöostase auszugehen. Betrachtet man im Vergleich dazu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* getriebene Embryonen, weisen diese einen leicht verstärkten Defekt auf, welcher näher charakterisiert werden muss. Es sind vermehrt unfusionierte FCM zu beobachten (Sternchen), die Morphologie einzelner Muskeln entspricht nicht dem Wildtyp, sondern sie sind keulenförmig ausgebildet (Pfeilkopf) und im anterioren Bereich liegen vermehrt sehr schmale Muskeln vor (Abb. 36C, Pfeil). Die intrazelluläre Lokalisation von Drp1 Δ GTPase-mcherry und Drp1 Δ GED-mcherry entspricht der von einer zytoplasmatischen Verteilung von Drp1-fl-myc mit vereinzelt Ansammlungen.

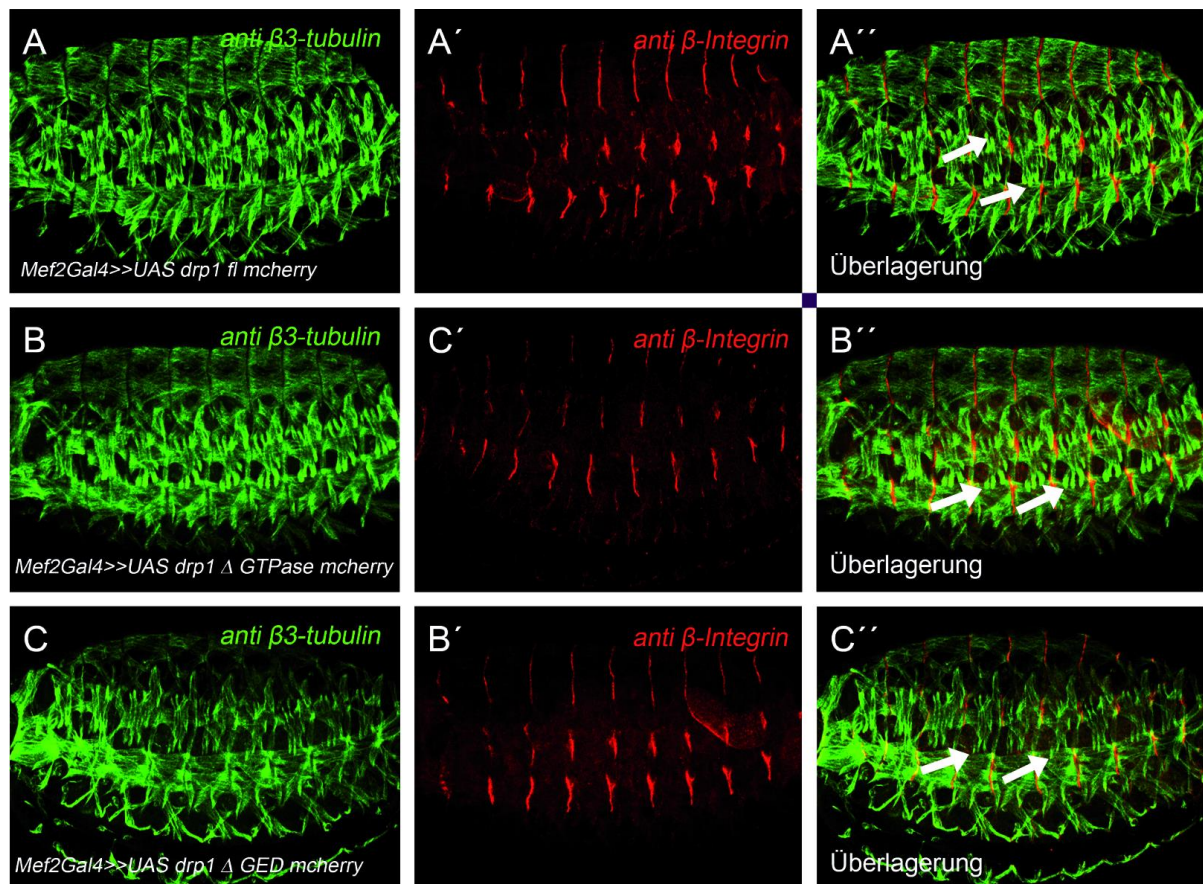




**Abb. 36: Der Verlust der GED-Domäne von Drp1 führt zu einem stärkeren Phänotyp.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta 3$ -TubulinAntikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. In A ist eine schematische Übersicht beider Deletionskonstrukte von Drp1 dargestellt. *Mef2-Gal4>>UAS drp1 Δ GTPase-mcherry* getriebene Embryonen weisen einige unfusionierte FCMs auf (B, Sternchen). Ein Antikörperrnachweis des Fusionsproteins mittels anti-RFP zeigt eine gleichmäßige zytoplasmatische Lokalisation (B'). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* führt zu vermehrt vorliegenden unfusionierten FCMs (C, Sternchen) keulenförmig ausgeprägte Muskeln (Pfeilkopf) sowie dünneren Muskeln (Pfeil). Drp1 Δ GED mCherry lokalisiert in vereinzelt punktierte Ansammlungen im Zytoplasma (C', C'' Pfeil).

Im Weiteren wurde mittels einer  $\beta$ PS2-Integrin-Antikörper Färbung der Embryonen untersucht, ob neben dem leichten Fusionsdefekt auch ein Amheftungsdefekt vorliegt, bei dem die Muskeln ihre epidermale Anheftungsstelle nicht mehr erreichen. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* sowie beider Deletionskonstrukte

*Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GTPase-mcherry* und *Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GED-mcherry* hat keinen Einfluss auf das korrekte Erreichen der epidermalen Anheftungsstellen der Myotuben (Abb. 37B-C, Pfeile). Überraschenderweise zeigen *Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GTPase-mcherry* getriebene Embryonen keine Muskel-Anheftungsdefekte, obwohl lateral keulenförmig ausgeprägte Muskeln zu beobachten sind, welche oft auf einen epidermalen Anheftungsdefekt hinweisen (Abb. 36B, 37B).



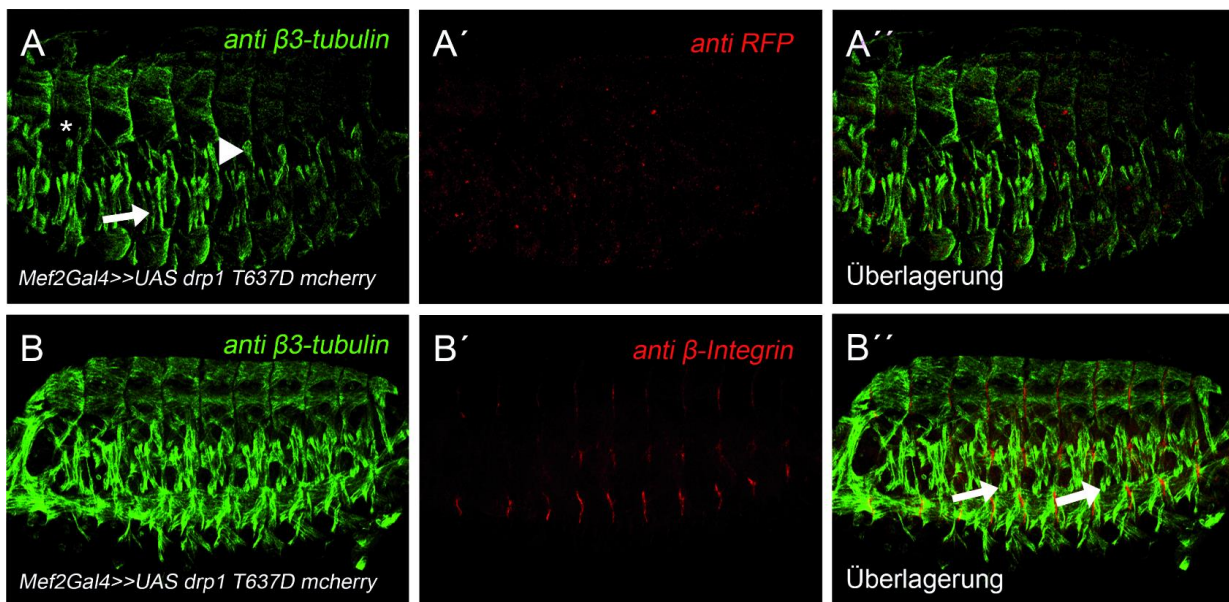
**Abb. 37:** Die Expression von *UAS-drp1-fl-mcherry*, *UAS-drp1  $\Delta$  GTPase-mcherry* und *UAS-drp1  $\Delta$  GED-mcherry* führt keinem Defekt in der Anheftung der Muskeln. Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Die epidermalen Anheftungsstellen der Myotuben wurden mittels eines  $\beta$ PS2-Integrin Antikörpers visualisiert. Anterior links, posterior rechts. Die Myotuben von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry*, *Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GTPase-mcherry* und *Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GED-mcherry* exprimierende Embryonen erreichen ihre epidermalen Anheftungsstellen (A-C, Pfeil).

Die Expression eines vollständigen (fulllength; fl) Drp1 Fusionsproteins mit TGXGal4 oder Mef2-Gal4 führt zu einem mit *drp1<sup>1</sup>*- und *drp1<sup>2</sup>*-Mutanten vergleichbaren Phänotyp. Die Lokalisation der Fusionsproteine scheint dabei allerdings vom Tag-abhängig zu sein. Drp1-fl-myc scheint dabei quantitativ weniger punktuell zu lokalisieren als dies für Drp1-fl-mcherry beobachtet werden konnte. Wenn Drp1 eine Rolle in der Relokalisation der Mitochondrien zum Zellkontakt während des Fusionsprozesses einnimmt, würde man aufgrund der Assoziation von Drp1 mit den Mitochondrien neben der zytoplasmatischen Lokalisation auch eine punktierte Ansammlung von Drp1 erwarten. Dies konnte mit der Expression von Drp1-fl-mcherry gezeigt werden, welche allerdings im Widerspruch zur Lokalisation von Drp1-fl-myc steht. Eine klare Aussage wie Drp1 während der Myoblastenfusion lokalisiert könnte über den Nachweis des endogen vorliegenden Drp1 mittels einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem Drp1 Antikörper erbracht werden. Des Weiteren konnte zwar gezeigt werden, dass die GTPase-Domäne essentiell für die Interaktion mit Blow ist, aber dagegen zeigen Embryonen, welche *UAS-drp1 Δ GED-mcherry* exprimieren eine leichte Verstärkung des Phänotyps. Es ist noch unklar, ob die leichte Verstärkung des Phänotyps auf eine Drp1 assoziierte Funktion der nicht vorhandenen GED-Domäne beruht oder ob mit dem Verlust der GED-Domäne ein Shift in der mitochondrialen Homöostase entsteht.

In der neurologischen Synapse bei Vertebraten wurde gezeigt, dass eine Dephosphorylierung an Position S637 von Drp1 zu einer Assoziation von Drp1 mit Mitochondrien führt (Cereghetti et al. 2008; Guerini 1997; Verstreken et al. 2005). Durch die Expression eines phosphomimic *drp1*-Konstruktes wurde untersucht, ob ein dadurch potentiell dominant-negativ wirkendes Drp1 einen Einfluss auf die Myoblastenfusion hat. *Drosophila* Drp1 weist an Position 637 nicht wie für Vertebraten beschrieben ein Serin auf, sondern ein Threonin auf (Verstreken et al. 2005). Daher wurde der offene Leserahmen, dem ein Aminosäureaustausch an Position T637D eingefügt wurde in einen pUAST-Expressionsvektor mit einem C-terminalen mCherry-Tag kloniert. Laut einer NetPhosDatenbank-Suche stellt dieses Threonin ebenfalls eine potentielle Phosphorylierungsstelle dar. Daher wurde an dieser Position T637 Threonin gegen Asparaginsäure ausgetauscht, welches einer konstitutiv aktiven Phosphorylierung entspricht. Da nun aufgrund des Aminosäureaustausches bei einer Aktivierung des Drp1 Signalweges keine Dephosphorylierung von Drp1 an dieser Position mehr stattfinden kann, ist zu erwarten, dass es zu keiner Relokalisation mehr kommen kann. Das in *Drosophila* eingebrachte phosphomimic



Konstrukt wurden mit Hilfe des *UAS-Gal4* Systems mit einer *Mef2Gal4* Treiberlinie exprimiert. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-mcherry* führt zu dem bereits bei *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* getriebenen Embryonen beobachteten Phänotyp. Dabei liegen einige FCM unfusioniert (Sternchen) vor, die lateralen Muskeln zeigen eine keulenförmige Morphologie (Pfeilkopf) und die anterioren Muskeln erscheinen deutlich schmaler (Abb. 38B, Pfeil). Andere Embryonen weisen dagegen einige unfusionierte FCM auf (Abb. 38A, Sternchen). *Drp1-T637D-mCherry* lokalisiert zytoplasmatisch in punktierten Strukturen (Abb. 38A', Pfeile). Dies ist vergleichbar mit der Lokalisation von *Drp1-fl-mCherry*. Auch eine Antikörperfärbung gegen  $\beta$ PS2-Integrin zeigt, dass kein Anheftungsdefekt der einzelnen Muskeln an die Epidermis besteht (Abb. 38B'', Pfeil).



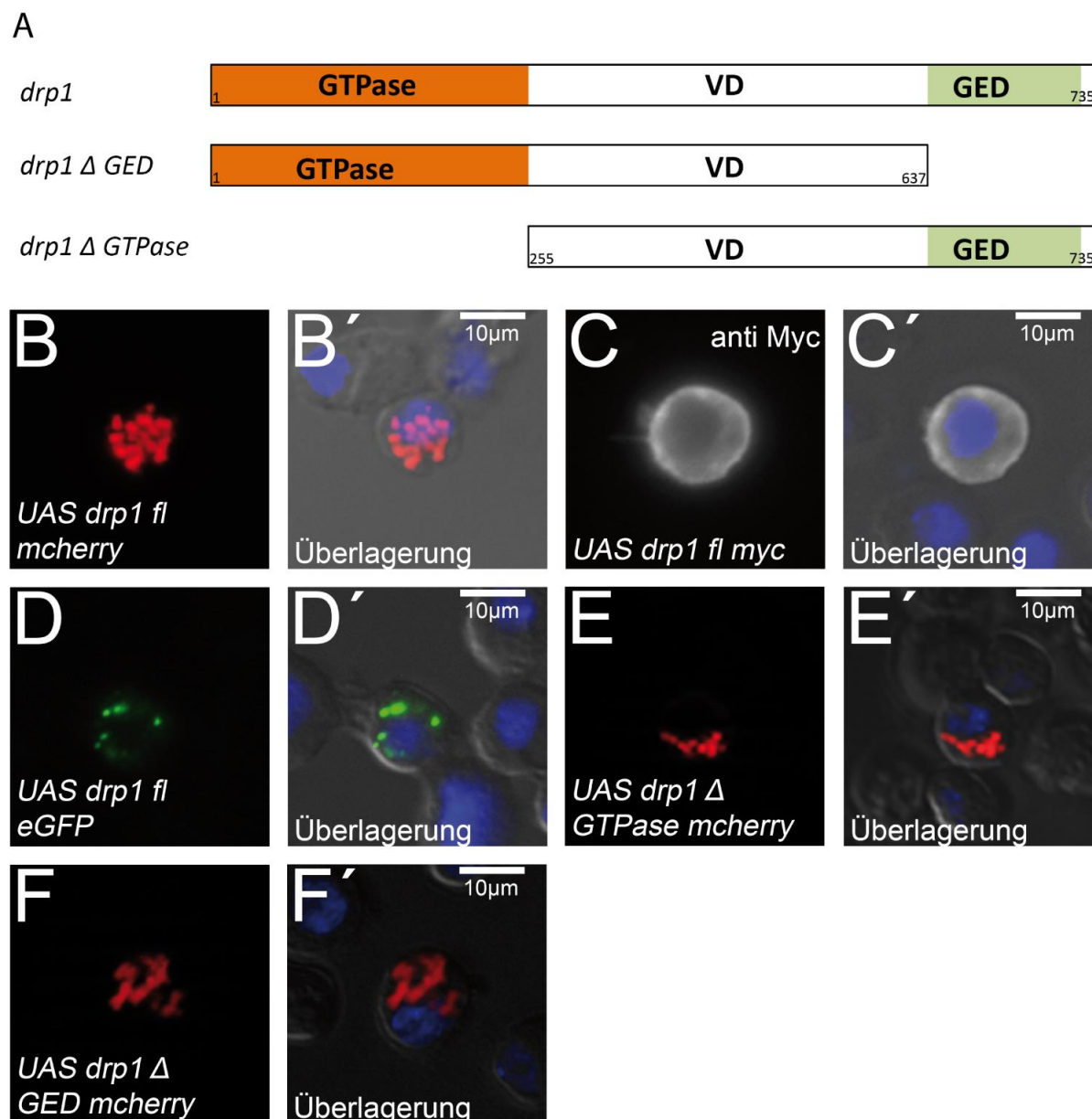
**Abb. 38: Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-mcherry* führt zu einem leichten Defekt in der Formation der Muskeln.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-mcherry* getriebene Embryonen zeigen einige unfusionierte FCM (A, Sternchen), dünnere Muskeln (Pfeil) und keulenförmige laterale Muskeln (Pfeilkopf). Ein Antikörpernachweis von mCherry des Fusionsproteins mittels anti-RFP zeigt vereinzelt Akkumulationen im Zytoplasma (A'). Ein Antikörpernachweis von  $\beta$ PS2-Integrin zeigt, dass alle Muskeln ihre epidermale Anheftungsstelle erreichen (B, Pfeil).

Die Expression eines phosphomimic *Drp1* Konstruktes führt zu keinem starken Defekt während der Myogenese. Es findet vermutlich keine Relokalisation mehr statt, welche augenscheinlich

keinen Einfluss auf die Myoblastenfusion von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-mcherry* zu haben. Es könnte auch sein, dass das bereits endogen vorliegende Drp1 für eine normale Muskelentwicklung ausreichend ist. Daher sollte zur weiteren Charakterisierung alle generierten *drp1*-Konstrukte zum einen im *drp1<sup>l</sup>*-und *blow<sup>2</sup>*-Mutanten Hintergrund einzukreuzen werden, um zu untersuchen, ob eine funktionelle Beziehung zwischen Blow und Drp1 vorliegt und welche Domänen von Drp1 essentiell für diese sind.

### 3.7.5 Drp1 scheint partiell in punktierte Strukturen in SL2 Zellen zu lokalisieren

Die Lokalisation von Drp1-Konstrukten im Embryo war nicht ganz eindeutig zu bestimmen. Insbesondere die Lokalisation von Drp1-fl-mcherry im Vergleich zu Drp1-fl-myc wies eine deutliche Diskrepanz auf. Um die Frage nach der Lokalisation der Konstrukte weiter zu beantworten, wurden die UAS-Konstrukte in *Drosophila* SL2 Zellen mit Hilfe von ActinGal4 exprimiert. Eine Übersicht der UAS-Konstrukte ist in Abb. 39A dargestellt. Die Visualisierung des Myc-getaggtten Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers, wohingegen mCherry und eGFP direkt am Mikroskop verfolgt werden konnten. Der Zellkern und das Aktinzytoskelett wurden mit DAPI und Phalloidin sichtbar gemacht. Drp1 fl mCherry ist zytoplasmatisch lokalisiert mit deutlichen Akkumulationen in punktierten Strukturen (Abb. 39B). Drp1-fl-Myc lokalisiert ähnlich wie in Embryonen hauptsächlich zytoplasmatisch. Es scheint als ob ein Teil von Drp1-fl-Myc an der Zellmembran mit punktuellen Strukturen assoziiert ist (Abb. 39C, Pfeil). Drp1-fl-eGFP weist dagegen ähnlich wie Drp1 fl mCherry eher eine punktierte Verteilung auf (Abb. 39D). Sowohl bei Drp1  $\Delta$  GTPase-mCherry als auch Drp1  $\Delta$  GED-mCherry konnte eine vorwiegend vesikuläre Lokalisation beobachtet werden (Abb. 39E, F).

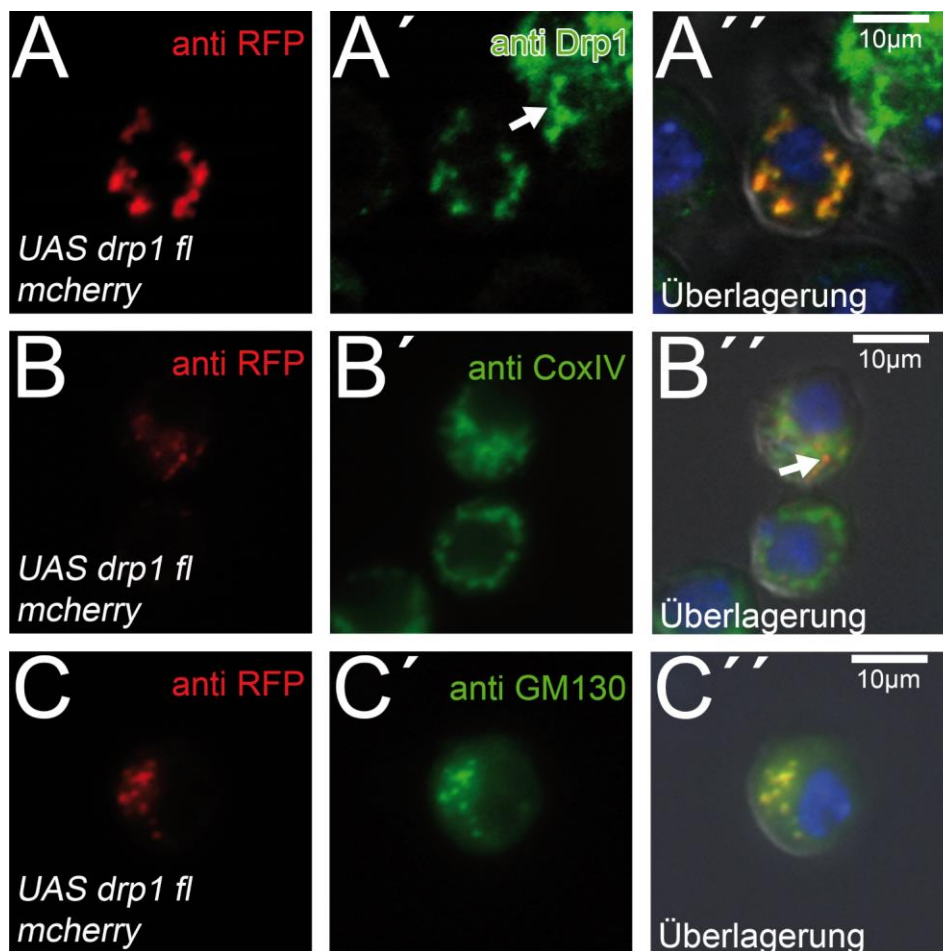


**Abb. 39: *UAS-Drp1-fl-mCherry*, *UAS-Drp1 Δ GTPase-mCherry* und *UAS-Drp1 Δ GED-mCherry* lokalisieren in punktuert im Zytoplasma.** Transfektion von SL2 Zellen. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. In A ist eine schematische Übersicht aller Drp1 Konstrukte dargestellt. Drp1-fl-mCherry lokalisiert in punktuert im Zytoplasma (B). Ein Antikörperrnachweis von Myc zeigt, dass Drp1-fl-Myc dagegen eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung (C). Drp1-fl-eGFP lokalisiert ebenfalls in punktuert (D). Auch Drp1 Δ GTPase-mCherry und Drp1 Δ GED weisen eine ähnliche punktuerte Lokalisation auf.

Die Lokalisation der einzelnen UAS-Konstrukte von Drp1 in SL2 Zellen weist ebenfalls darauf hin, dass eine Lokalisierung der Fusionsproteine möglicherweise Tag abhängig ist. Es könnte sein, dass der mCherry und eGFP Tag die Faltung des Proteins beeinträchtigt. Interessanterweise,

ist auch bei einer Expression von *UAS-drp1-fl-myc* eine Anreicherung von Drp1-fl-myc in Vesikel-ähnlichen Strukturen in der Nähe der Membran zu beobachten. *Life cell imaging* der SL2 Zellen und die Nutzung von Zellkompartiment Marker kann weiteren Aufschluss über die Lokalisation geben.

Mit Hilfe einer anti-Drp1, anti-CoxIV und anti-GM130 Antikörperfärbung an mit *UAS-drp1-fl-mcherry* transfizierten SL2 Zellen sollte untersucht werden, wie das Drp1 Fusionsprotein im Vergleich zu dem endogenen Drp1, zu Mitochondrien und dem Cis-Golgi Vesikeln lokalisiert. Wie erwartet, scheinen alle Drp1-fl-mCherry positiven Vesikel-ähnliche Strukturen mit dem Drp1 Antikörper Signal zu Co-lokalisieren (Abb. 40A, Pfeil). Da der Antikörper nicht nur das artifiziell exprimierte Drp1 erkennt, sondern auch das endogene Drp1, erkennt man im gesamten Zytoplasma der Zelle ein leichtes Signal für Drp1. Interessanterweise lokalisiert das endogene Drp1 in der nicht transfizierten Nachbarzelle, ebenfalls punktuell (Abb. 40A, Pfeil). Da Drp1 als Regulatorprotein der mitochondrialen Teilung gut beschrieben ist, sollte zumindest ein Teil von Drp1 mit Mitochondrien assoziiert sein (Verstreken et al. 2005). Daher wurde dies mit Hilfe einer anti-CoxIV Antikörperfärbung überprüft. Tatsächlich kann eine partielle Co-Lokalisation zwischen Drp1-fl-mCherry und Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 40B, Pfeile). Außerdem wurde überprüft, ob Drp1 mit cis-Golgi Vesikeln lokalisiert, da aus Studien in Vertebraten bekannt ist, dass Drp1 häufig posttranslational modifiziert wird. Neben Phosphorylierungen an verschiedenen Positionen, sind außerdem Ubiquitinierungen, Sumoylierungen, S-nitrierungen sowie O-GlcNAcylierung beschrieben worden (Pagliuso et al. 2017). Drp1-fl-mCherry scheint tatsächlich zu einem großen Teil mit Cis-Golgi Vesikeln assoziiert zu sein (Abb. 40C).



**Abb. 40: Drp1 fl mCherry Co-lokalisiert mit endogenen Drp1, Mitochondrien und GM130.** Transfektion von SL2 Zellen. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Ein Antikörperrnachweis von Drp1 an *UAS-drp1-fl-mcherry* transfizierten Zellen bestätigt eine Co-Lokalisation von des endogenen Drp1 und Drp1-fl-mCherry (A). Auch in der untransfizierten Nachbarzelle lokalisiert Drp1 punktuert (A', Pfeil). Mittels eines Antikörperrnachweises von CoxIV konnte eine partielle Co-Lokalisation von Mitochondrien und Drp1-fl-mCherry gezeigt werden (B, Pfeil). Drp1-fl-mCherry Co-lokalisiert partiell auch mit GM130, welche mittels eines Antikörperrnachweises gezeigt wurde.

Ein Antikörperrnachweis von Drp1 konnte zeigen, dass es auch in Wildtyp-Zellen unabhängig von der Expression von Drp1-fl-mcherry zur Akkumulation von Drp1 in punktuerten Strukturen kommt. Dies spricht dafür, dass es möglicherweise aufgrund einer sehr guten Transfektionseffizienz der SL2 Zellen zu einer zu hohen Expression der Fusionsproteine kommt, was die starke Assoziation von Drp1-fl-mCherry in punktuerten Strukturen erklären könnte. Um das Expressionslevel anzupassen, könnte die Etablierung einer stabilen Drp1-fl-mCherry Zelllinie eine Möglichkeit darstellen. Die Nutzung beispielsweise eines Lysosom Trackers könnte über die

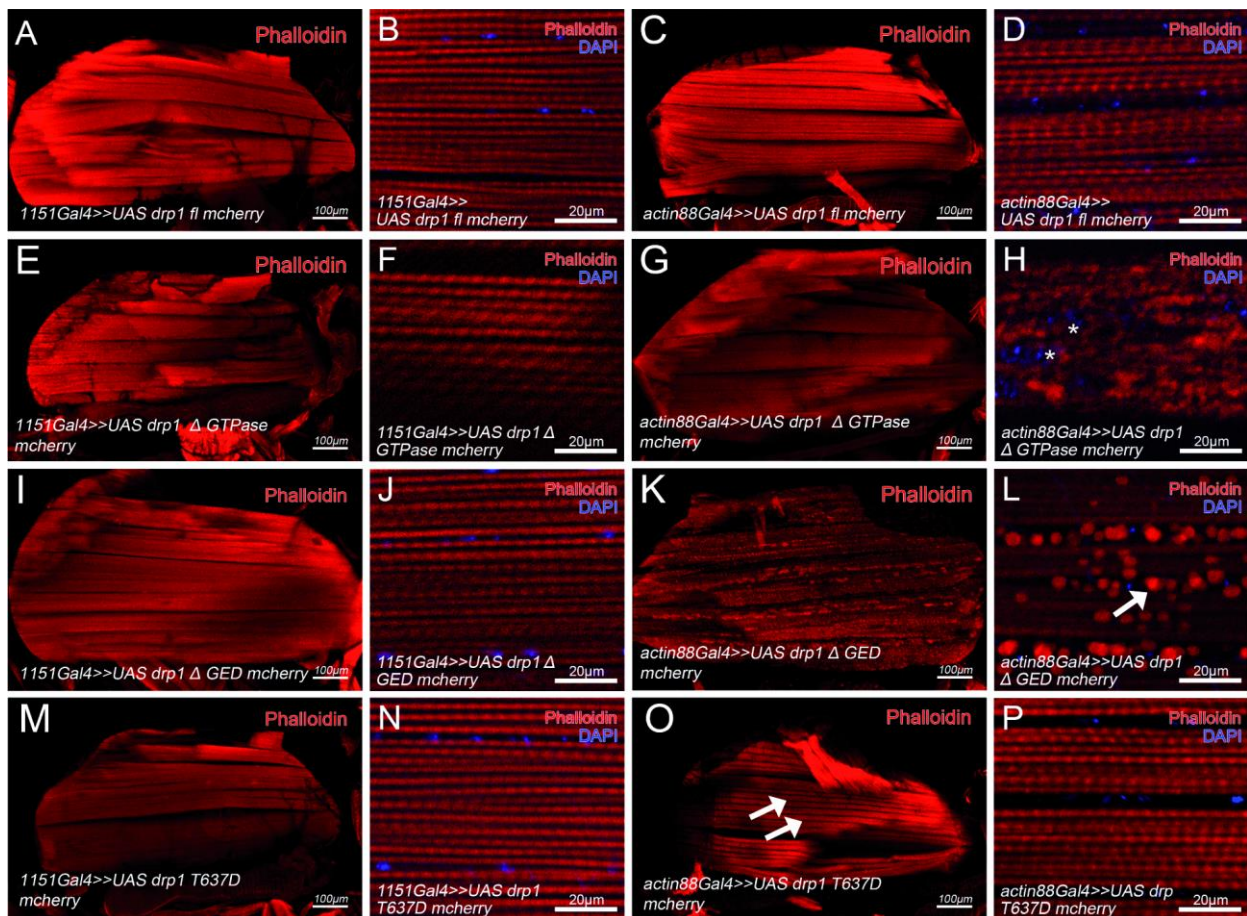
Funktionalität der exprimierten Konstrukte Aufschluss geben. Die partielle Co-Lokalisation von Drp1 mit dem Mitochondrien Marker CoxIV liefert erste Hinweise auf die bereits für Vertebraten beschriebene partielle Assoziation von Drp1 mit Mitochondrien. Bestätigt werden könnte dies mit Hilfe eines Mitotracker in life imaging der S12 Zellen. So wäre auch eine Übersicht über die Dynamik der Co-Lokalisation möglich.

### 3.7.6 Eine Expression von Drp1-Deletionen während der Entwicklung der adulten IFM scheint zu einem starken Defekt in der Etablierung der Sarkomerstruktur zu führen

Eine *in situ*-Hybridisierung von *Drosophila* Embryonen mit Hilfe einer *drp1* RNA Sonde konnte zeigen, dass die *drp1* mRNA bereits im syncytialen Blastoderm sehr stark ausgeprägt vorhanden ist. Die Embryonen besitzen somit eine starke maternale Komponente für *drp1*. Somit besteht die Möglichkeit, dass die maternale Komponente einen Teil der in *drp1*-Mutanten fehlenden Drp1 Funktion ersetzt. Um dies zu testen wurden, die zuvor beschriebene *UAS-drp1-fl-mcherry*, *UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry*, *UAS-drp1 Δ GED-mcherry* und *UAS-drp1-T637D-mcherry* Fliegenlinien verwendet und diese mit Hilfe von zwei verschiedenen, für die adulte Flugmuskulatur spezifischen Treiberlinien, exprimiert. Verwendet wurden dafür 1151Gal4 sowie Actin88Gal4. Alle Konstrukte wurden sowohl mit 1151- als auch Actin88Gal4 in den Puppen exprimiert und die wenige Tage alten adulten Fliegen fixiert und mit einem Skalpell lateral in die Hälfte geschnitten. Die Muskulatur sowie die Zellkerne wurden mit Phalloidin und DAPI sichtbar gemacht. Im Folgenden deuten teilweise abgerissene Fragmente einzelner Muskeln auf keinen Phänotyp hin, da dies auf die experimentelle Vorgehensweise zurückgeführt werden kann. Betrachtet werden im weiteren Verlauf die DLM der indirekten Flugmuskulatur. Die Expression von sowohl *1151Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry*, *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry*, *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* als auch *1151Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* in allen AMPs führt zu keinem sichtbaren Defekt in der Struktur der DLM (Abb. 41A, E, I, M). Dies wird ebenfalls durch eine vergrößerte Aufnahme der Sarkomerstruktur dieser Linien deutlich (Abb. 41B, F, J, N). *actin88>>UAS-drp1-fl-mcherry* exprimierende Fliegen weisen ebenfalls eine normale Entwicklung der Muskelstruktur auf (Abb. 41C, D). Dagegen führt die Expression von *actin88>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* zu einer komplett ungeordneten Struktur der Muskeln, mit einer wahllosen Verteilung von F-Aktin. Der Aufbau der geordneten Sarkomerstruktur findet nicht mehr statt, auch die normale Positionierung der Zellkerne oberhalb jedes Muskelabschnittes

ist nicht mehr vorhanden (Abb. 41H, Sternchen). Auch *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* getriebene Fliegen wiesen einen Defekt in der Sarkomerstruktur auf (Abb. 41K). Innerhalb eines Muskels findet partiell ein Aufbau einer Sarkomerstruktur statt, allerdings akkumuliert ein Teil des F-Aktins jedes Muskels und liegt als runde Struktur vor (Abb. 41L, Pfeile). Betrachtet man die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* in der DLM scheint zwar der Aufbau der Sarkomerstruktur wildtypisch zu sein (Abb. 41P), allerdings ist die Verbindung der einzelnen Aktinfilamente partiell nicht mehr vorhanden, was zu einer ausgefächerten Erscheinung der Muskeln führt (Abb. 41O, Pfeile).



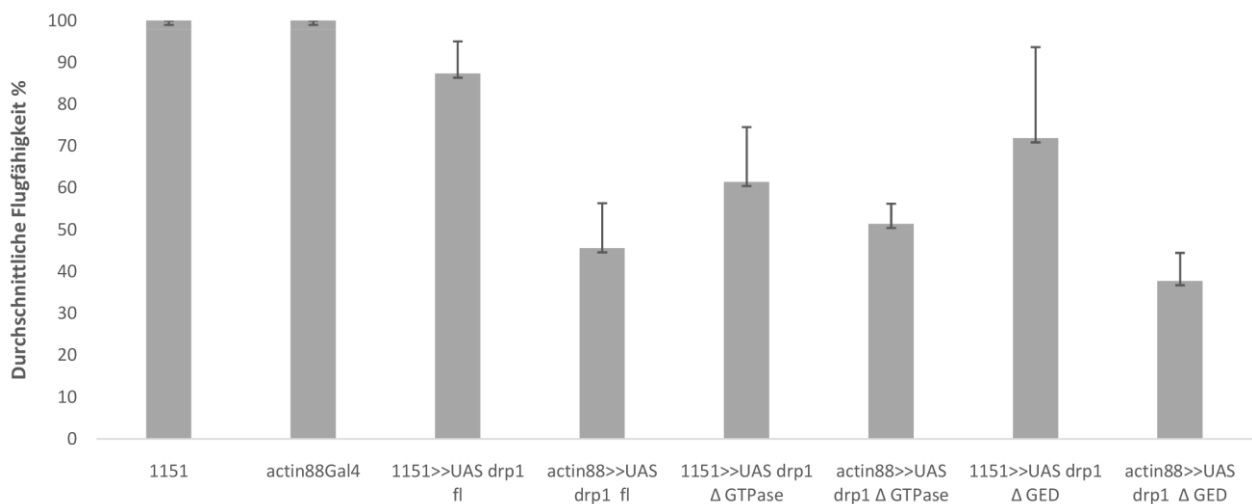


**Abb. 41: Die Expression von *UAS-drp1*  $\Delta$  *GTPase-mcherry* und *UAS-drp1*  $\Delta$  *GED-mcherry* mittels *Actin88Gal4* scheint den interfilamentären Verbindung zu beeinflussen.** Die adulte Flugmuskulatur wurde mittels Phalloidin und DAPI gefärbt um das Aktinzytoskelett und die Zellkerne zu visualisieren. Außerdem wurde jeweils eine Detailaufnahme der Filamentstruktur aufgenommen. Anterior links, posterior rechts. Die Expression von *1151Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry*, *1151Gal4>>UAS-drp1*  $\Delta$  *GTPase-mcherry*, *1151Gal4>>UAS-drp1*  $\Delta$  *GED-mcherry* als auch *1151Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* in allen AMPs führt zu keinem sichtbaren Defekt in der Struktur der DLM (A, B, E, F, I, J, M, N). *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* exprimierende Fliegen weisen einen normalen Aufbau der Filamentstruktur (C, D). Die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1*  $\Delta$  *GTPase-mcherry* zu einer komplett ungeordneten Struktur der Muskeln, mit einer wahllosen Verteilung von F-Aktin und Zellkernen (G, H, Sternchen). *Actin88Gal4>>UAS-drp1*  $\Delta$  *GED-mcherry* exprimierende Fliegen wiesen einen Defekt in der Sarkomerstruktur auf (K, L Pfeil). *Actin88Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* exprimierende Fliegen weisen eine ausgefächerten Erscheinung der Muskeln auf (O).

Das durchschnittlichen Flugverhaltens von *UAS-drp1-fl-myc*, *UAS-drp1 Δ GTPase-myc* und *UAS-drp1 Δ GED-myc* exprimiert mit 1151Gal4 und Actin88Gal4 wurde statistisch ausgewertet und im Vergleich zu Wildtypkontrollen betrachtet. In *1151Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebenen



Tieren sinkt die durchschnittliche Flugfähigkeit im Vergleich zu den Wildtypkontrollen um 12% (Abb. 42). Dagegen zeigen *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebene Tiere eine Reduktion um 54%. Die Expression von *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* zeigen eine Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit von 38%, Tiere die *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* exprimieren zeigen dagegen eine Reduktion um 48%. In *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* exprimierten Tieren ist eine Reduktion der Flugfähigkeit um 28%, in *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* getriebenen Tieren dagegen zu einer Reduktion von 62% zu beobachten.



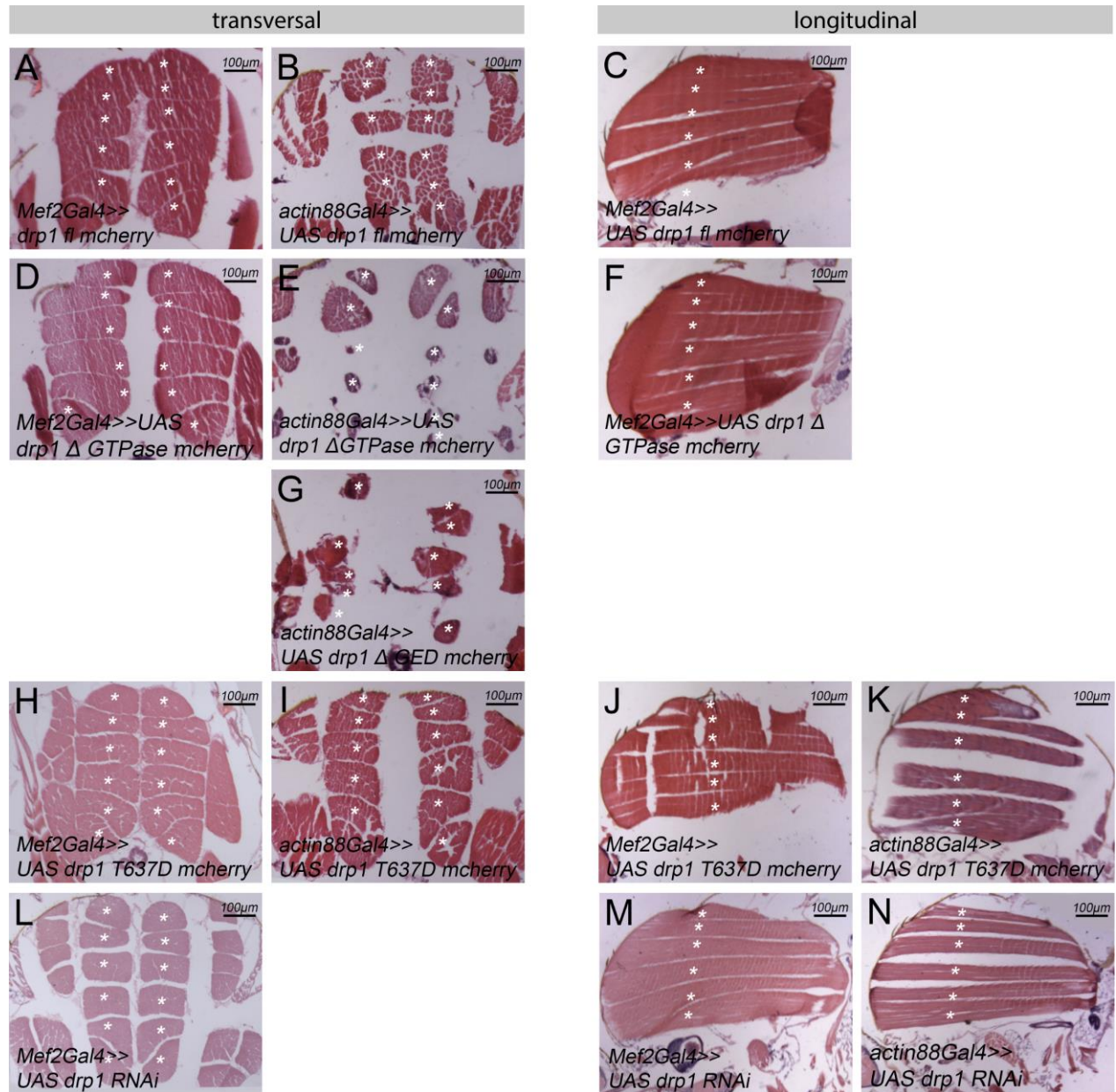
**Abb. 42: Die Expression von *UAS-drp1-fl*, *UAS-drp1 Δ GTPase* und *UAS-drp1 Δ GED* resultiert in einer verminderten Flugfähigkeit.** Heterozygote *1151*; *W<sup>1118</sup>* und *actin88*; *W<sup>1118</sup>* Fliegen dienen als Wildtypkontrolle. Fliegen beider Gruppen sind zu 100% in der Lage zu fliegen. In *1151Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebenen Tieren sinkt die durchschnittliche Flugfähigkeit im Vergleich zu den Wildtypkontrollen um 12%. *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebene Tiere zeigten dagegen eine Reduktion um 54%. Tiere die *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* exprimieren zeigen eine Reduktion von 38%, Tiere die *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* exprimieren dagegen eine Reduktion um 48%. Eine Expression von *1151Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* führt zu einer Reduktion um 28%, eine Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* dagegen zu einer Reduktion von 62%.

Die Daten bieten einen ersten Anhaltspunkt, dass Drp1 möglicherweise keine Funktion während der frühen Entwicklung der AMPs einnimmt, aber möglicherweise eine Rolle während des Aufbaues der Sarkomerstruktur hat oder es zu einem Degenerationsdefekt führt. Besonders der komplette Verlust der Sarkomerintegrität in *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc*

getriebenen Fliegen weist darauf hin, dass möglicherweise die GTPase-Domäne von Drp1 eine wichtige Funktion einnimmt. Dies steht im Einklang mit den aus dem Hefe-2Hybrid Interaktionstest gewonnenen Daten. Da die GTPase Domäne essentiell für eine Interaktion mit Blow ist. Eine eindeutige Aussage ist noch nicht möglich, da es sich auch um Dystrophieeffekt handeln könnte. Um dies weiter zu untersuchen können Paraffinschnitte an Fliegen kurz vorm schlüpfen mit Schnitten an drei Tage alten Fliegen verglichen werden. Auch würde die Anwendung von Markern für den Aufbau der Sarkomere weiteren Einblick liefern. So ist zu Zeit noch unklar, ob Drp1 am korrekten Aufbau der Sarkomerstruktur mit verantwortlich ist oder ob es eine Rolle beispielsweise beim Ausrichten von Aktinfilamenten einnimmt.

Die Analyse der F-Aktinstruktur der Fliegenhälften lässt keinen Schluss über die Integrität des Muskels zu. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Paraffindünnschnitte dieser Fliegenlinien durchgeführt. Dazu wurden sowohl *UAS-drp1-fl-mcherry*, *UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry*, *UAS-drp1 Δ GED-mcherry* als auch *UAS-drp1-T637D-mcherry* mit Hilfe von *Mef2-Gal4* und *Actin88Gal4* exprimiert. Außerdem wurde getestet, ob der knockdown von Drp1 mittels *drp1* RNAi einen Effekt auf die Formation der DLM hat. Zum einen wurden sowohl transversale Sektionen als auch longitudinale Sektionen angefertigt. Ähnlich wie dies für die Expression der Konstrukte mit *1151Gal4* bereits gezeigt werden konnte, führt die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry*, *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry*, *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* als auch *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* zu keinem wahrnehmbaren Defekt in der Formation der Muskulatur (Abb. 43A, B, D, E, H, I). Sowohl die transversen Sektionen als auch die longitudinalen Sektionen erscheinen wildtypisch. Dies trifft ebenfalls auf einen knockdown von Drp1 mit Hilfe einer *drp1* RNAi Linie exprimiert mit *Mef2Gal4* zu (Abb. 43L, J). Die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 fl mcherry* mit resultiert in einer Verkleinerung der einzelnen Muskelbündel (Abb. 43C). Auch die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* führt zu einer drastischen Reduktion in der Muskelgröße, wobei die Anzahl der Muskeln dem des Wildtyps entspricht (Abb. 43F, G). Ähnlich wie die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* führt die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1-T637D-myc* zu einer Verkleinerung der Muskelbündel (Abb. 43J, K). Teilweise sind größere Lücken zwischen den einzelnen Bündeln zu erkennen (Abb. 43J, Pfeilkopf). Der knockdown von Drp1 mit Hilfe von *Actin88Gal4* führt zu kleiner ausgeprägten Muskeln (Abb. 43K). Es wurde eine

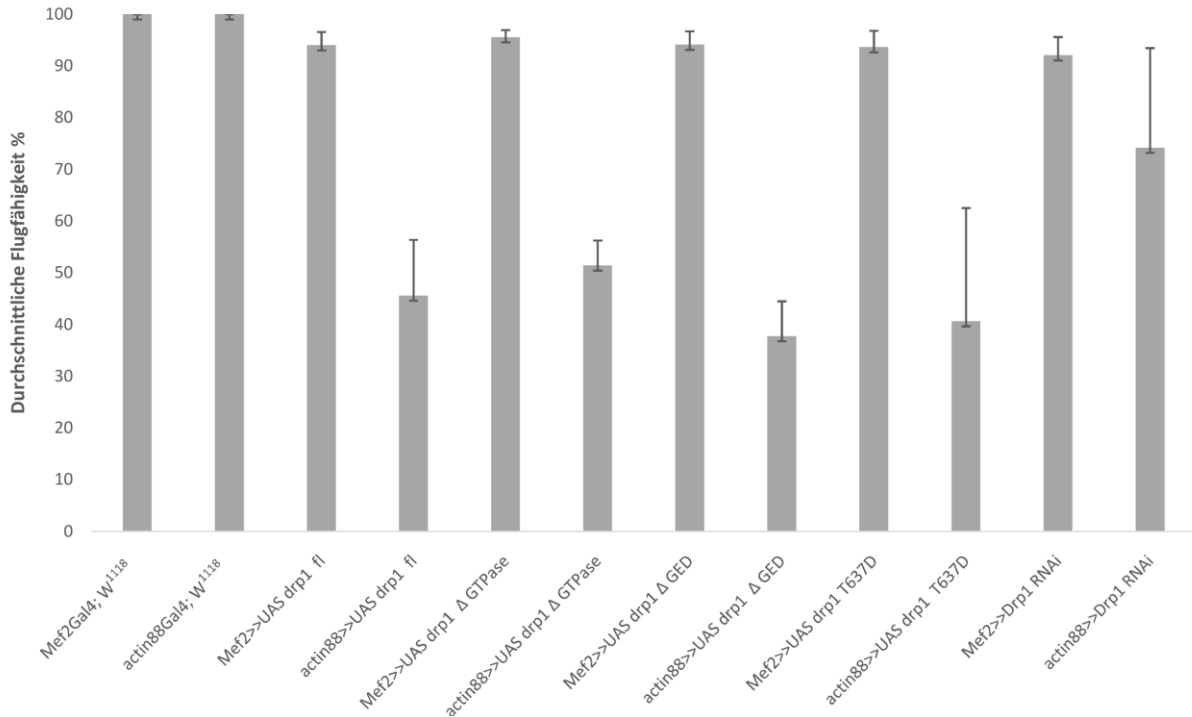
statistische Auswertung der durchschnittlichen Flugfähigkeit aller Linien exprimiert mit Mef2-Gal4 und Actin88Gal4 durchgeführt. Eine deutliche Beeinträchtigung der Flugfähigkeit konnte nur bei actin88Gal4 exprimierten Linien beobachtet werden.



**Abb. 43:** Transversale und longitudinale Paraffinschnitte an *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* getriebenen Fliegen zeigen einen starken Defekt in der Entwicklung der adulten DLM. Es wurden transversale und longitudinale Paraffinschnitte an der adulten Flugmuskulatur durchgeführt und diese mittels Hämatoxylin und Eosin Y gefärbt um das Zytoplasma und die Zellkerne zu

visualisieren. Die Expression von *UAS-drp1-fl-myc*, *UAS-drp1 Δ GTPase-myc*, *UAS-drp1 Δ GED-myc* als auch *UAS-drp1-T637D-myc* und eine Herunterregulierung von Drp1 mittels RNAi mittels Mef2-Gal4 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der DLM (A, B, D, E, H, I, L, M). Die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1-T637D-myc* führt zu einer Verkleinerung der einzelnen Muskelbündel (C, J, K). Die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* führt zu sehr stark verkleinerten Muskeln (F, G). Eine Runterregulierung von Drp1 mittels *actin88Gal4* führt zu kleineren Muskeln (N).

Das durchschnittlichen Flugverhaltens von *UAS-drp1-fl-myc*, *UAS-drp1 Δ GTPase-myc*, *UAS-drp1 Δ GED-myc*, *UAS-drp1-T637D-myc* und einer Drp1 RNAi exprimiert mit Mef2-Gal4 und *Actin88Gal4* wurde statistisch ausgewertet und im Vergleich zu Wildtypkontrollen betrachtet. Im Vergleich zum Wildtyp und zu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebenen Fliegen zeigen *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebene Fliegen eine 54% Reduktion in der durchschnittlichen Flugfähigkeit. Ähnlich dazu führte die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* im Vergleich zu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-myc* zu einer Reduktion in der Flugfähigkeit von 48%. Eine noch deutlicher Reduktion von 62% in der Flugfähigkeit weisen *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* getriebene Fliegen im Vergleich zu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* auf. Auch die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1-T637D-myc* in den Fliegen führt zu einer deutlichen Reduktion der Flugfähigkeit von 59% im Vergleich zu *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-myc* getriebenen Fliegen. Im Gegenteil zu allen anderen getesteten Drp1-Konstrukten führte die Runterregulierung von Drp1 mRNA mittels einer Drp1 RNAi exprimiert mit *actin88Gal4* lediglich zu einer Reduktion in der durchschnittlichen Flugfähigkeit von 25% (Abb. 44).



**Abb. 44:** Die Expression von *UAS-drp1-fl*, *UAS-drp1 Δ GTPase*, *UAS-drp1 Δ GED*, *UAS-drp1 Δ GED-myc*, *UAS-drp1-T637D-myc* und *Drp1 RNAi* resultiert in einer verminderten Flugfähigkeit. Heterozygote *1151Gal4*; *W<sup>1118</sup>* und *Actin88Gal4*; *W<sup>1118</sup>* Fliegen dienen als Wildtypkontrolle. Fliegen beider Gruppen sind zu 100% in der Lage zu fliegen. Da alle Drp1-Konstrukte getrieben mit Mef2-Gal4 lediglich eine geringfügige Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit aufwiesen, werden heterozygote *Actin88Gal4* Fliegen im Vergleich zu heterozygoten Mef2-Gal4 und Wildtyp Fliegen betrachtet. In *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* getriebenen Tieren sinkt die durchschnittliche Flugfähigkeit um 54%. *UAS-drp1 Δ GTPase-myc* getriebene Tiere zeigen eine ähnliche Reduktion um 48%. Tiere die *UAS-drp1 Δ GED-myc* exprimieren zeigen eine deutliche Reduktion von 62%, Tiere die *UAS-drp1-T637D-myc* exprimieren eine ähnliche Reduktion um 59%. Eine Runterregulierung der Drp1 mRNA mittel RNAi resultierte in einer schwachen Reduktion der Flugfähigkeit um 25%.

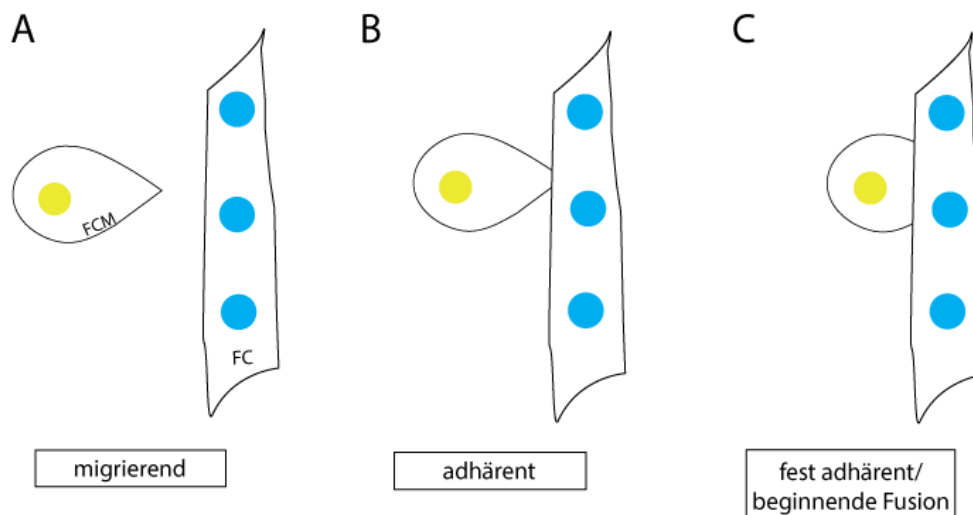
Die Analyse der Paraffindünnschnitte konnte zeigen, dass der Einfluss der Drp1 Expression davon abhängig zu sein scheint, wann die Expression dieser während der Entwicklung der DLM erfolgt. Die Expression von Mef2-Gal4 sollte während der gesamten Entwicklung der adulten Muskulatur stattfinden, wohingegen Actin88Gal4 erst ab der Anheftung der Muskeln ab etwa 18 Stunden APF mit der Expression startet. Eigentlich würde die Ausprägung von Phänotypen eher in Mef2-Gal4 exprimierten Muskeln erwartet werden, da hier die Konstrukte, die gesamte Entwicklung über exprimiert werden. Hier könnte das zeitliche Expressionsmuster beider Treiberlinien mit Hilfe von UAS-eGFP genauer aufzeigen, ab wann diese Linien tatsächlich

exprimieren und in welchem Gewebe genau. Allerdings scheint die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry*, *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* entweder ab der Anheftung der Muskeln an die Epidermis sehr stark in die Entwicklung der Muskeln einzugreifen oder es handelt sich um Muskeldystrophieeffekt. Der Verlust der GTPase- und der GED-Domäne scheint entweder das Wachstum und damit die späteren Fusion zu beeinträchtigen oder einen degenerativen Effekt auf die Bildung der einzelnen Muskeln zu haben. Auch die bei *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* beobachtete Verkleinerung der Muskelbündel könnte auf einen degenerativen Effekt hinweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Aktivität von Drp1 vermittelt über seine GTPase-Domäne und die normalerweise stattfindende Dephosphorylierung an Position 637 einen Einfluss auf die Homöostase der Mitochondrien haben könnte. Um hier weitere Hinweise zu erhalten, könnte die Nutzung eines CoxIV-Antikörpers oder eines Mitochondrien Trackers in Cryosektionen der DLM helfen. Auch die genaue Vermessung der relativen Muskelfläche pro Muskel im Vergleich zum Wildtyp, sowie die Nutzung von Degenerationsmarkern könnte weiteren Einblick in den Phänotyp geben. Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass Drp1 durchaus eine Funktion während der Entwicklung der Muskulatur spielen könnte, insbesondere scheinen sowohl seine GTPase- als auch seine GED-Domäne essentiell dafür zu sein scheint.

### 3.7.7 Mitochondrien lokalisieren dynamisch während des Fusionsprozesses

Drp1 stellt ein Schlüsselregulator der mitochondrialen Teilung dar. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass Drp1 und Blow nicht nur auf Proteinebene miteinander interagieren. Die bis jetzt gesammelten Daten deuten darauf hin, dass auch eine genetische Interaktion vorliegt. Es besteht allerdings weiterhin die Frage, welche Funktion Drp1 während der Myoblastenfusion einnimmt. Da bereits aus Beispielen an der IS und der neurologischen Synapse bekannt ist, dass es dort Drp1-abhängig zu einer Relokalisation von Mitochondrien Richtung Zellkontakt kommt, wurde im Weiteren untersucht, ob sich dies auch für die Myoblastenfusion in *Drosophila* beobachten lässt (Kummerow et al. 2009; Quintana et al. 2007). Dafür wurden verschiedene während der Myoblastenfusion essentielle Proteine auf die Lokalisation von Mitochondrien in adhärierenden und sich gerade in Fusion befindlichen FCM hin untersucht. In Abbildung 45 ist schematisch dargestellt welche Phasen der Fusion ausgewertet wurden. Die erste Gruppe von FCMs die

ausgewertet wurde befindet sich in der Migration, erkennbar an der tropfen-ähnlichen Form der FCM (Abb. 29 A). Die zweite Gruppe von FCMs in denen die Lokalisation der Mitochondrien bestimmt wurde sind gerade adhären gewordenen FCMs (Abb. 29B). FCM, welche fest adhären sind oder sich in einer beginnenden Fusion befinden zählen zur dritten Gruppe (Abb. 29C). Diese weisen eine zur FC hin abgeflachte Seite auf.



**Abb. 45: Schematische Darstellung der berücksichtigten Fusionsphasen von FCM.** In Gelb sind FCM dargestellt und in blau Fc. Während der Migration weisen FCM eine Tropfen-ähnliche Form auf (A). Bei einer Adhäsion weisen FCM zunächst noch eine zugespitzte Form auf (B). Während einer zunehmend fester werdenden Adhäsion oder bereits beginnender Fusion ist eine der FC zugewandte Abflachung der FCM zu sehen (C).

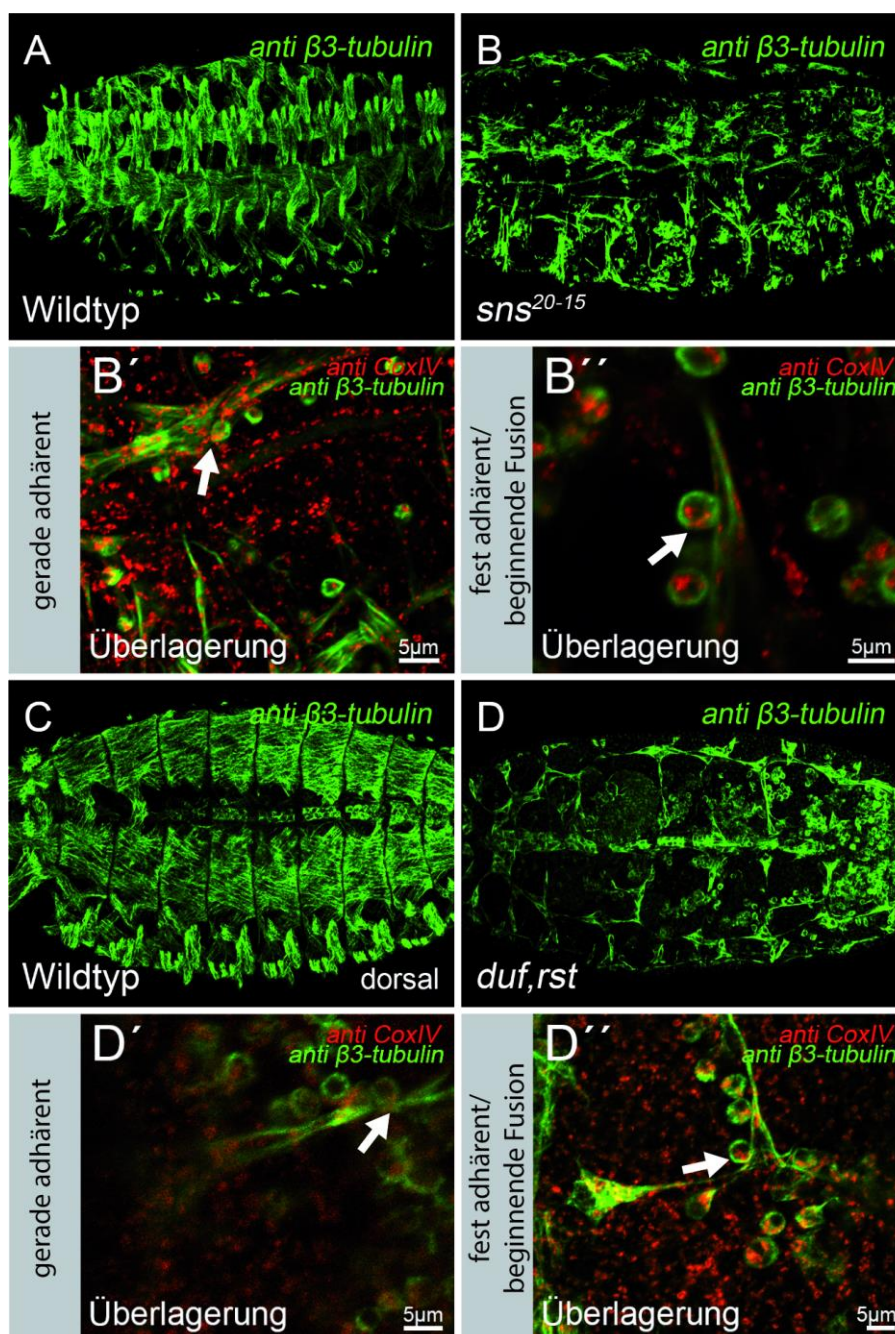
Die Lokalisation wurde in Mutanten der IgSFs: *sns*<sup>20-15</sup> und einer Doppelmutante für *duf*, *rst*, Adapterproteinen: *sing*<sup>22</sup> und *rols*<sup>117</sup> sowie einem bekannten Aktinregulator: *kette*<sup>J4-48</sup>, bestimmt (Übersicht siehe Tab. 1). Visualisiert wurde die Muskulatur und die Mitochondrien mit Hilfe eines  $\beta$ 3-Tubulin sowie CoxIV-Antikörpers. Die Lokalisation der Mitochondrien in FCM, welche gerade begonnen haben zu adhären, sowie FCM welche schon fester adhären sind wurde untersucht. Dabei deutete eine abgeflachte Kontaktstelle eine feste Adhäsion oder beginnende Fusion an.

**Tab. 1: Zusammenfassende Übersicht über die Funktionalität der verwendeten Mutationen.** Bewertet wurde inwieweit die Adhäsion, die Signalweiterleitung und die Aktin Reorganisation in den einzelnen Mutanten beeinträchtigt ist. Ein + indiziert, dass der entsprechende Schritt noch funktioniert, ein – zeigt ein Funktionsverlust ab diesem Schritt der Myoblastenfusion an. *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten besitzen eine Punktmutation in der intrazellulären Domäne, allerdings finden hier noch häufiger Fusionen statt. In *duf*, *rst*-Mutanten kommt es zu einem Verlust der Adhäsion. In *sing*<sup>22</sup>- und *rols*<sup>117</sup>-Mutanten ist die Signalweiterleitung beeinträchtigt und in *kette*<sup>j4-48</sup>-Mutanten ist die Reorganisation des F-Aktins gestört.

	Verlust Adhäsion	Weiterleitung	Aktin
<i>sns</i> <sup>20-15</sup>	+	+	+
<i>duf</i> , <i>rst</i>	-	-	-
<i>sing</i> <sup>22</sup>	+	-	-
<i>rols</i> <sup>117</sup>	+	-	-
<i>kette</i> <sup>j4-48</sup>	+	+	-

In *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten konnten Mitochondrien während der Migration ausschließlich in der Spitze der Zelle und während der Adhäsion zu 80% als Foci (Abb. 31) am Zell-Zell Kontakt beobachtet werden (Abb. 29B, Pfeile). In fest adhärierenden FCM lokalisieren 8% der Mitochondrien am Zell-Zell Kontakt (Abb. 31, 30, Pfeile). *duf*, *rst*-Mutanten konnte während der Migration und Adhäsion der FCM eine Lokalisation von Mitochondrien auf der Seite der Migration und am Zellkontakt beobachtet werden (Abb. 31, 30D', Pfeil). Während einer festen Adhäsion oder beginnenden Fusion konnten keine Mitochondrien mehr am Zell-Zell Kontakt mehr beobachtet werden (Abb. 31, 30D'', Pfeil).

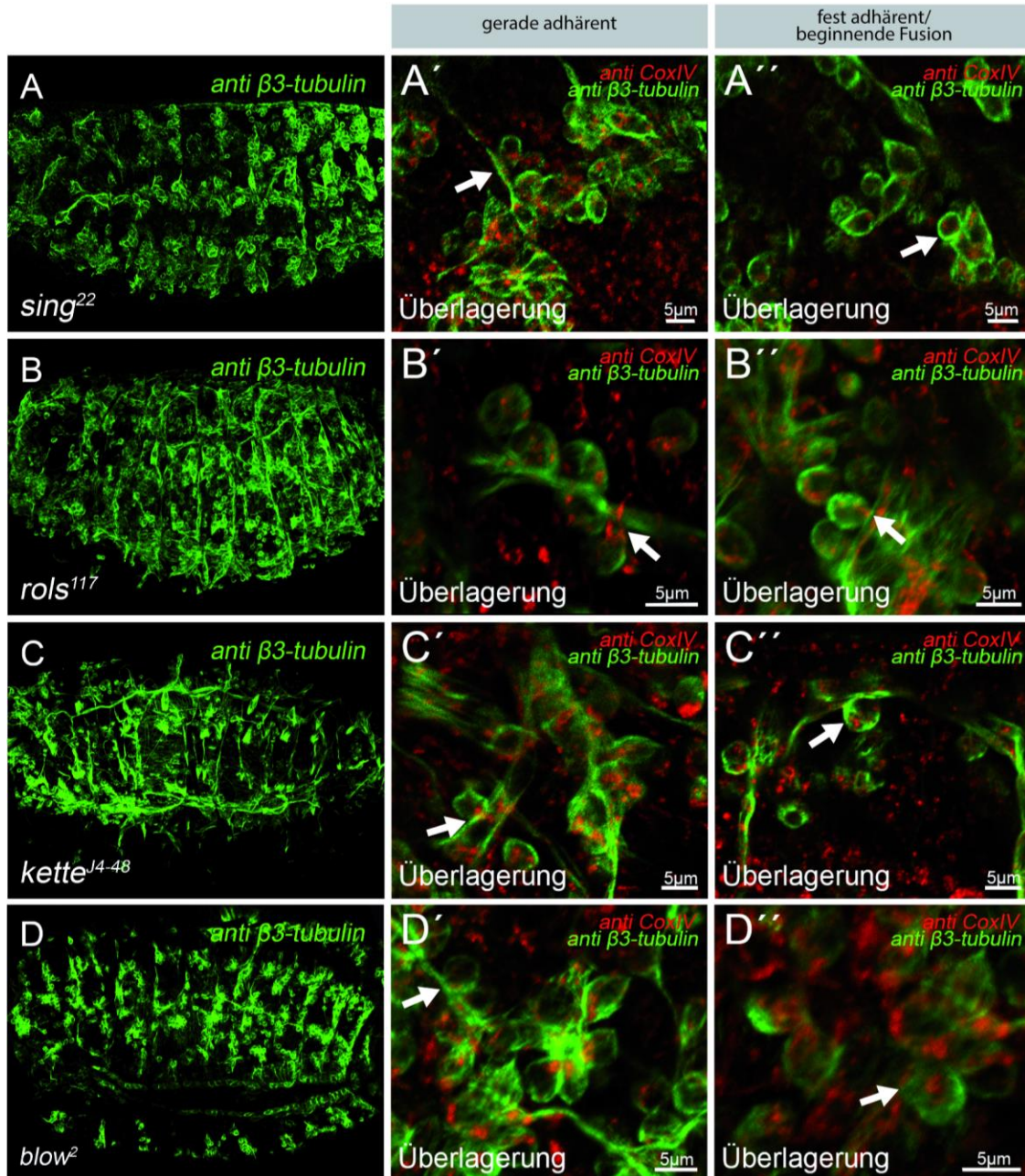




**Abb. 46:** Die Lokalisation der Mitochondrien scheint während des Fusionsprozesses in verschiedenen Mutanten sehr dynamisch zu sein. Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen β3-Tubulins Antikörpers sichtbar gemacht und die Mitochondrien mit Hilfe von anti-CoxIV Antikörpers. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp lateral (A) dargestellt kann das gleichmäßige Muskelmuster beobachtet werden. In *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten Mutanten lokalisieren die Mitochondrien während einer beginnenden Adhäsion in den meisten Fällen am Zellkontakt (B', Pfeil). Bei einer festen Adhäsion, konnte die Lokalisation der

Mitochondrien am Zellkontakt in den meisten Fällen nicht mehr beobachtet werden (Abb. B'', Pfeil). Für die Lokalisation von Mitochondrien in *duf*, *rst*-Mutanten (Abb. C', C'', Pfeil) konnte dies ebenfalls beobachtet werden.

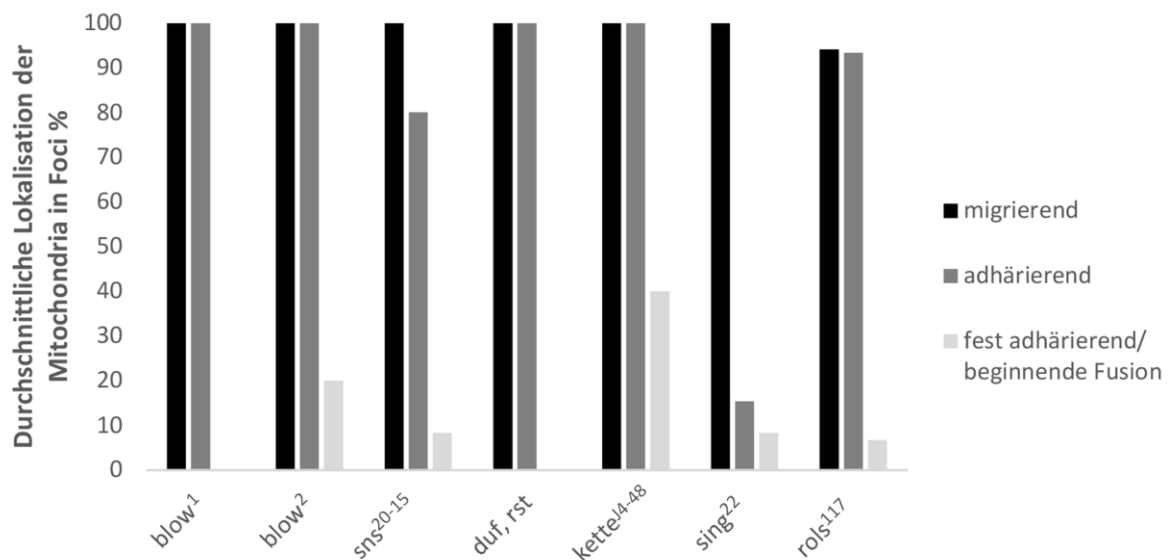
In *sing*<sup>22</sup>-Mutanten konnte nur in 15% der Fällen (Abb. 48) während einer beginnenden Adhäsion eine Lokalisation von Mitochondrien am Zellkontakt als Foci beobachtet werden (Abb. 47A', Pfeil) und noch 8% der Mitochondrien waren während einer festen Adhäsion am Zell-Zell Kontakt zu beobachten (Abb. 47A'', Pfeil). In *rols*<sup>117</sup>-Mutanten konnte während der Migration und einer festen Adhäsion der FCM eine Lokalisation von Mitochondrien größtenteils auf der Seite der Migration und am Zellkontakt beobachtet werden (Abb. 48, 47B', Pfeil). Während einer festen Adhäsion oder beginnenden Fusion waren nur noch in 6% der Fällen (Abb. 48) Mitochondrien am Zellkontakt zu beobachten (Abb. 47B'', Pfeil). In *kette*<sup>J4-48</sup>-Mutanten lokalisieren die Mitochondrien während der Migration und beginnenden Fusion zunächst am Zellkontakt (Abb. 47C', Pfeil). Während einer festen Adhäsion waren allerdings in 40% der Fällen (Abb. 48) eine Lokalisation der Mitochondrien am Zellkontakt zu beobachten (Abb. 47C'', Pfeil). Dies deutet auf eine verzögerte Relokalisation der Mitochondrien nach erfolgreicher Adhäsion hin. In *blow*<sup>2</sup>-Mutanten lokalisieren die Mitochondrien während der Migration und beginnenden Adhäsion in den meisten Fällen am Zellkontakt (Abb. 47D', Pfeil). Bei einer festen Adhäsion, lokalisieren die Mitochondrien nur noch in 20% der Fällen (Abb. 48) am Zell-Zell Kontakt (Abb. 47D'', Pfeil).



**Abb. 47: Die Lokalisation der Mitochondrien scheint während des Fusionsprozesses in verschiedenen Mutanten sehr dynamisch zu sein.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins Antikörpers sichtbar gemacht und die Mitochondrien mit Hilfe von anti-CoxIV Antikörpers. Anterior links, posterior rechts. Nach Initiation einer festen Adhäsion lokalisieren diese nicht mehr am Zellkontakt (B'', Pfeil). In *rols*<sup>117</sup>-Mutanten konnte anders als bei einer beginnenden Adhäsion, nach Initiation einer festen Adhäsion die Mitochondrien nicht mehr am Zellkontakt beobachtet werden (B', B'', Pfeil). In *sing*<sup>22</sup>-Mutanten konnte in den meisten Fällen während der beginnenden Adhäsion keine Lokalisation von Mitochondrien am Zellkontakt mehr beobachtet werden (A', Pfeil). Die Lokalisation der Mitochondrien blieb ebenfalls während einer festen Adhäsion bestehen (A'', Pfeil). In *kette*<sup>J4-48</sup>-Mutanten lokalisieren die Mitochondrien zunächst am

Zellkontakt (C', Pfeil) und auch teilweise während einer festen Adhäsion waren sie am Zellkontakt zu beobachten (C'', Pfeil). In *blow*<sup>2</sup>-Mutanten Mutanten lokalisieren die Mitochondrien während einer beginnenden Adhäsion in den meisten Fällen am Zellkontakt (B', Pfeil). Bei einer festen Adhäsion, konnte die Lokalisation der Mitochondrien am Zellkontakt in den meisten Fällen nicht mehr beobachtet werden (B'', Pfeil).

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine dynamische Lokalisation der Mitochondrien während des Fusionsprozesses. Auch deuten sie darauf hin, dass die Dynamik der Mitochondrien in Fusionsmutanten unterschiedlich gestört sein könnte.

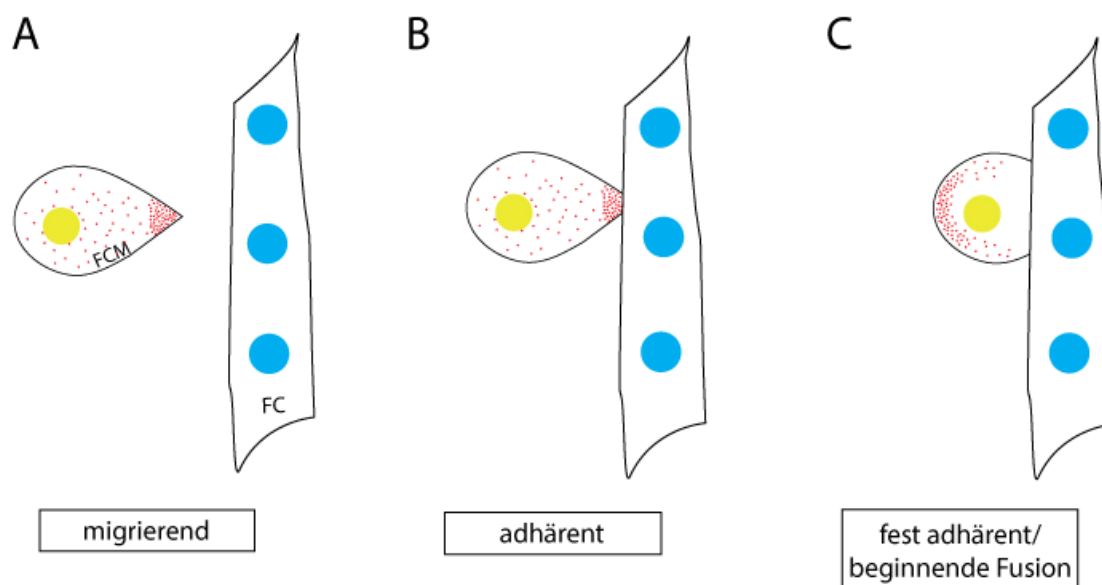


**Abb. 48: Die Relokalisation von Mitochondrien scheint dynamisch zu sein.** Eine statistische Auswertung der Lokalisation von Mitochondrien während der Migration der FCM, einer beginnenden und festen Adhäsion oder beginnenden Fusion. Während der Migration der FCM lokalisieren Mitochondrien in den Mutanten immer in der migrierenden Spitze. In *kette*<sup>14-48</sup>-Mutanten konnte die Mitochondrien während der beginnenden Fusion in 40% der untersuchten Fälle noch am Zellkontakt beobachtet werden. In *sing*<sup>22</sup>-Mutanten konnte nur in 15% der Fälle eine Lokalisation von Mitochondrien am Zellkontakt in adhärierenden FCM beobachtet werden.

Die Lokalisation von Mitochondrien scheint ein sehr dynamischer Prozess während der Fusion zu sein. In den meisten Fällen wurde eine lokale Akkumulation von Mitochondrien während der Migration und der gerade adhärierenden FCM an der Spitze der Migrationsrichtung oder des Zellkontaktes beobachtet. FCMs, welche deutlich fester an der FC/wachsenden Myotube adhärirt waren und es dort vermutlich zur Etablierung der FuRMAS gekommen war, zeigten häufig keine Mitochondrien mehr am Zellkontakt. Diese schienen von der Zellkontaktstellen



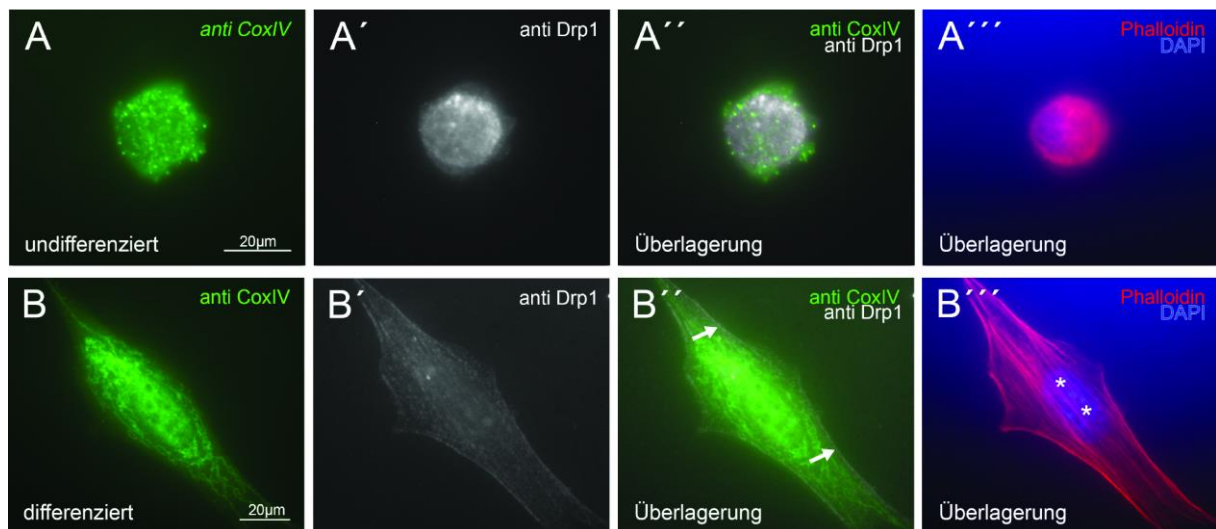
entfernt worden zu sein. Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die Lokalisation von Mitochondrien ein dynamischer Prozess zu sein scheint (Übersicht Abb. 49). Ob die Lokalisation der Mitochondrien allerdings in einzelnen Mutanten beispielsweise verzögert ihre Lokalisation ändert und auch zu welchem Zeitpunkt dies allgemein während der Fusion passiert, ist noch offen. Um dies beantworten zu können, würde sich die Nutzung einer Mito-GFP Linie, welche in den Wildtyp sowie in Mutanten eingekreuzt wird und Myoblasten spezifisch exprimiert wird, gut eignen. Da Mitochondrien in jedem Gewebe essentiell sind, könnte sich über die Expression der Mito-GFP Linie eine deutlich Reduktion des Hintergrundes erreichen lassen und könnte so eine eindeutigere Aussage über die Lokalisation der Mitochondrien zulassen. Vorstellbar wäre auch der Versuch die Lokalisation über *live imaging* zu untersuchen.



**Abb. 49: Zusammenfassende schematische Übersicht über die dynamische Lokalisation von Mitochondrien während der Myoblastenfusion.** In Gelb sind FCM dargestellt und in blau Fc. Während der Migration lokalisieren die Mitochondrien überwiegend in der Spitze der FCM (A). Bei einer Adhäsion befinden sich die Mitochondrien in den meisten Fällen noch am Zell-Zell Kontakt (B). Bei weiter vorangeschrittener Adhäsion/beginnender Fusion ist eine Relokalisation der Mitochondrien weg vom Zell-Zell Kontakt zu beobachten (C).

### 3.7.8 Die Lokalisation von Drp1 und Mitochondrien in primären undifferenzierten und differenzierten Mausmyoblasten scheint dynamisch zu sein

Eine CoxI-Antikörperfärbung in *Drosophila* Embryonen zeigen konnte, scheint die Lokalisation von Mitochondrien während des Fusionsprozesses dynamisch zu sein. Es konnten erste Hinweise auf eine mögliche Relokalisation der Mitochondrien nach erfolgreicher Anheftung der FCM an die FC/wachsende Myotube gezeigt werden (siehe Abb. 46 und 47). Um diesen Prozess weiter zu untersuchen, wurden primäre Mausmyoblasten für drei Tage entweder unter proliferations- oder unter differenzierungs-Bedingungen kultiviert, fixiert und die Zellen mit einem Antikörper gegen Drp1 und CoxIV behandelt. Dies ermöglicht die Visualisierung von Drp1 im Vergleich zu den Mitochondrien. Zusätzlich wurden die Zellkerne und das F-Aktin Zytoskelett mit Hilfe von DAPI und Phalloidin sichtbar gemacht. In undifferenzierten primären Mausmyoblasten lokalisieren die Mitochondrien punktiert in der gesamten Zelle (Abb. 50A). Drp1 dagegen ist eher gleichmäßig in den Zellen lokalisiert mit vereinzelt punktierten Ansammlungen, die partiell mit Mitochondrien zu Co-lokalisieren scheinen (Abb. 50A'', Pfeil). In differenzierten Zellen ergibt sich für die Erscheinung der Mitochondrien ein ganz anderes Bild. Hier liegen die Mitochondrien hauptsächlich in einer netzartigen Struktur vor (Abb. 50B). Drp1 scheint in differenzierten Zellen vermehrt an der Zellmembran und in der Nähe der F-Aktinbündel zu lokalisieren (Abb. 50B', Pfeil).



**Abb. 50: Differenzierung von primären Mausmyoblasten geht mit einer Veränderung der Mitochondrien Morphologie einher.** Primäre Mausmyoblasten wurden drei Tage unter proliferierenden oder differenzierenden

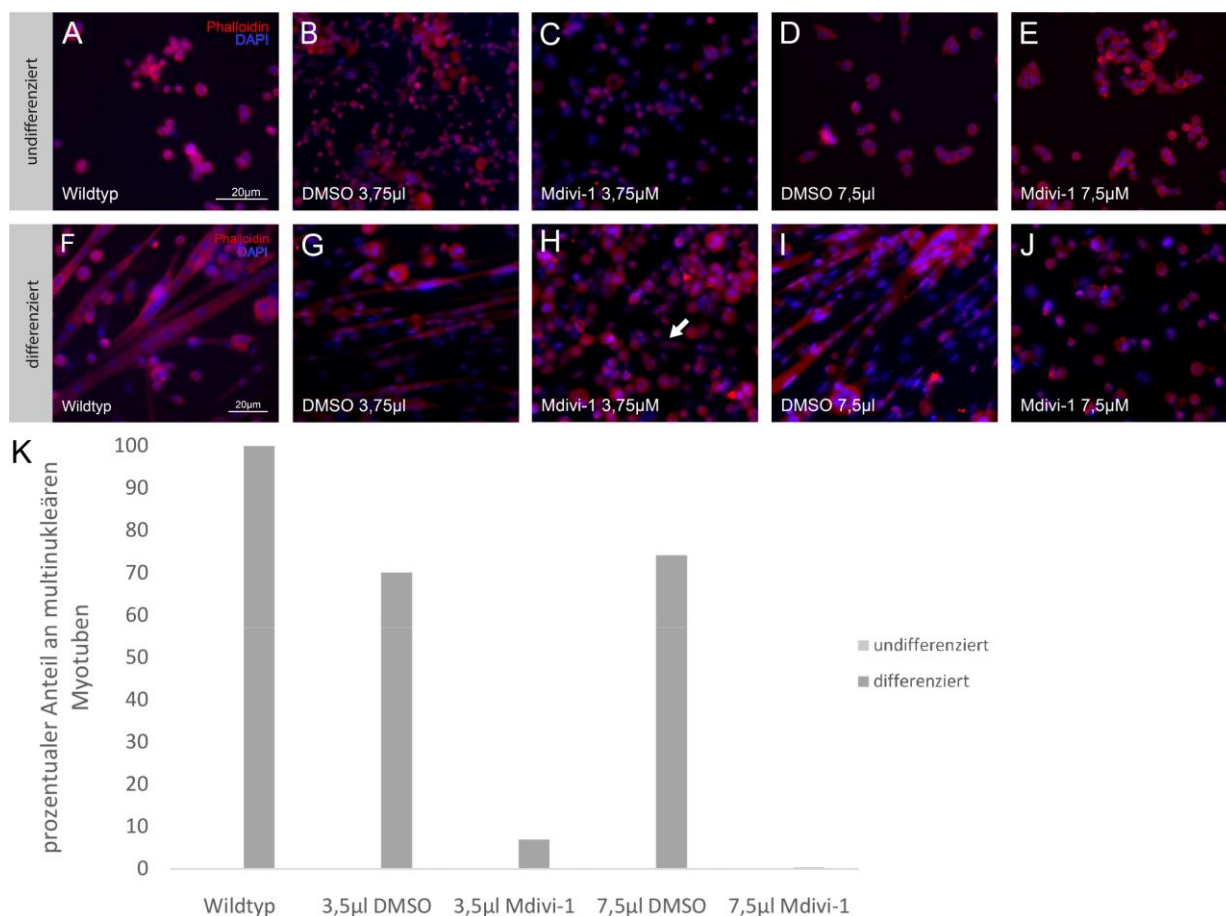
Phalloidin und DAPI gefärbt. Zusätzlich wurde ein Antikörpernachweis von CoxIV und Drp1 durchgeführt. In undifferenzierten Zellen liegen die Mitochondrien vereinzelt vor und lokalisieren partiell mit Drp1 (A). In differenzierten Zellen bilden die Mitochondrien ein Netzwerk aus, welches partiell mit Drp1 Co-lokalisiert (B'', Pfeil). Sternchen kennzeichnen die Zellkerne (B''').

Die Lokalisation von Drp1 und Mitochondrien in undifferenzierten und differenzierten primären Mausmyoblasten weist auf einen Shift in der Morphologie der Mitochondrien während des Differenzierungsprozess hin. Vereinzelte punktierte Mitochondrien in undifferenzierten Zellen, welche auf eine hohe Aktivität von Drp1 hinweisen, erfahren während der Differenzierung eine Elongation, was auf eine Abnahme in der durch Drp1 induzierten mitochondrialen Teilung hinweist. Interessant ist hier die Frage, wie die Lokalisation von Drp1 und Mitochondrien aussieht, wenn eine Fusion der Zellen eingeleitet wird. Bis jetzt war eine Aufnahme dieser Situation noch nicht möglich.

### **3.7.9 Die Aktivität von Drp1 scheint für die Differenzierung von primären Mausmyoblasten essentiell zu sein**

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Differenzierungsprozesses von primären Mausmyoblasten eine Umstrukturierung der Mitochondrien einhergeht, die auf eine verringerte Aktivität von Drp1 hinweist. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob ein Funktionsverlust von Drp1 die Differenzierung und Fusion von den Zellen beeinflusst. Dafür wurden primäre Mausmyoblasten nach einem Tag unter poliferations-Bedingungen aufgeteilt und entweder drei Tage lang unter poliferations- oder differenzierungs-Bedingungen und verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Mdivi-1 inkubiert. Mdivi-1 ist ein Drp1 spezifischer Inhibitor, welcher in DMSO gelöst genutzt wurde. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen einer negativ Kontrolle. Als Referenz dienen Zellen, welche drei Tage unter poliferations- oder differenzierungs-Bedingungen kultiviert wurden. Alle Zellen wurden mit DAPI und Phalloidin gefärbt um die Zellkerne und das F-Aktin Zytoskelett zu visualisieren. Die Inkubation der undifferenzierten Zellen mit DMSO oder Mdivi-1 zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Abb. 51A-E). Differenzierte Zellen dagegen zeigen schon bei einer Konzentration von 3,75µM Mdivi-1 zeigen nur noch etwa 7% der Zellen Fusionensevents im Vergleich zum Wildtyp und der entsprechenden DMSO Kontrolle (Abb. 51F, G, H, K, Pfeil). Die

mit DMSO behandelten Kontrollen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Reduktion der Fusionsevents um etwa 26% (Abb. 51K). Bei einer Konzentration von 7,5 $\mu$ M Mdivi-1 konnten im Vergleich zur DMSO Kontrolle keine Fusionsevents mehr beobachtet werden (Abb. 51I, J, K).



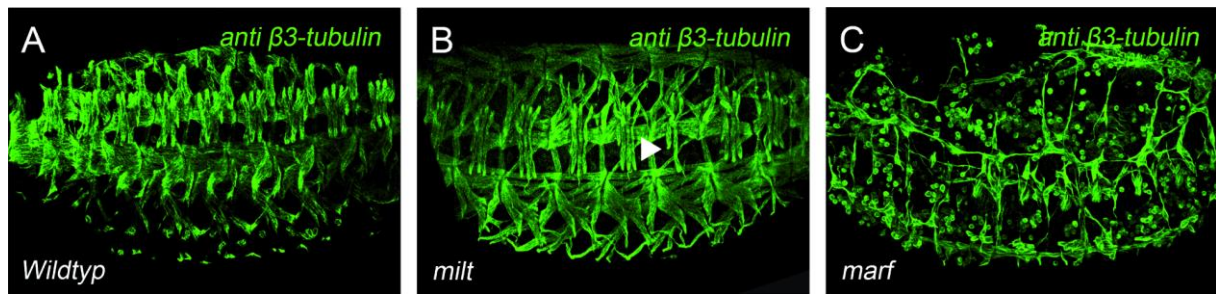
**Abb. 51: Die Inhibition von Drp1 beeinträchtigt die Differenzierung von primären Mausmyoblasten.** Primäre Mausmyoblasten wurden drei Tage unter proliferierenden oder differenzierenden Bedingungen kultiviert und Konzentrationen des Drp1 Inhibitors Mdivi-1 oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts und der Zellkern wurden die Zellen mit Phalloidin und DAPI gefärbt. Unter proliferierenden Bedingungen bleiben die Zellen einkernig und rund (A). Unter differenzierenden Bedingungen bilden die Zellen multinukleäre Myotuben (F). Mdivi-1 wurde entweder in 3,5 $\mu$ M oder 7,5 $\mu$ M und zur Kontrolle die gleich Menge an DMSO eingesetzt. In undifferenzierten Zellen hat die Inkubation von Mdivi-1 und DMSO keine festgestellte Auswirkung (B-E). Die Inkubation von differenzierten Zellen mit 3,5 $\mu$ M Mdivi-1 (H) führt zu einer 93%igen Reduktion in der Fusionseffizienz im Vergleich zur Kontrolle (G, K). Eine Inkubation von differenzierten Zellen mit 7,5 $\mu$ M Mdivi-1 (I) führt zu einem kompletten Stopp der Fusion im Vergleich zur Kontrolle (I, K).



Diese Ergebnisse stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein. Dort konnte an C2C12 Zellen sowie primären Mausmyoblasten gezeigt werden, dass die Anwendung von Mdivi-1 zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der Fusionsevents führt. Außerdem wurde eine signifikant reduzierte Expression der muskelspezifischen Markern MyoD, Myogenin und MHCI beobachtet. Diese werden normalerweise bei Beginn des Differenzierungsprozesses exprimiert. Eine reduzierte Expression der muskelspezifischen Marker weist auf eine verzögerte Differenzierung hin. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass die Inhibition von Drp1 einen Einfluss auf die Differenzierung der Myotuben haben könnte (Kim et al. 2013). Die Frage, ob Drp1 nur an dem Differenzierungsprozess oder später auch eine Rolle bei der eigentlichen Fusion spielt bleibt offen.

#### 3.7.10 Der Verlust von Milton oder Marf führt zu beeinträchtigter Formation der Muskulatur

Bis jetzt ist noch unklar welche Funktion Drp1 während der Myoblastenfusion einnimmt und ob diese direkt mit seiner Funktion als Schlüsselprotein der mitochondrialen Teilung zusammenhängt oder nicht. Die Lokalisation von Mitochondrien scheint während des Fusionsprozesses dynamisch zu sein, was darauf schließen lässt dass deren Mobilität eine Rolle spielen könnte. Um weitere Einblicke in diesen Prozess zu erhalten, wurden zwei Proteine untersucht, welche an dem Transport von Mitochondrien beteiligt sind. Der Mikrotubuli-abhängige Transport der Mitochondrien beruht auf der Funktion von Milton (Milt) als Adapterprotein zwischen Kinesin-1 und den Mitochondrien (Glater et al. 2006). Der mitochondrial-associated-regulatory-factor (Marf, *Drosophila* Mitofusion) dagegen, ist neben seiner Funktion im Transport von Mitochondrien auch am Fusionsprozess dieser beteiligt (Sandoval et al. 2014). *milt*-Mutanten zeigen einen Defekt in der Ausbildung der Muskulatur im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 52A, B). Teilweise fehlen vereinzelt Muskeln (Pfeilkopf) und die Muskeln erscheinen dünner im Vergleich zum Wildtyp zu sein. Im Vergleich zu *milt*-Mutanten weisen *marf*-Mutanten einen sehr starken Fusionsdefekt mit sehr vielen unfusioniert vorliegenden FCM auf (Abb. 52C).



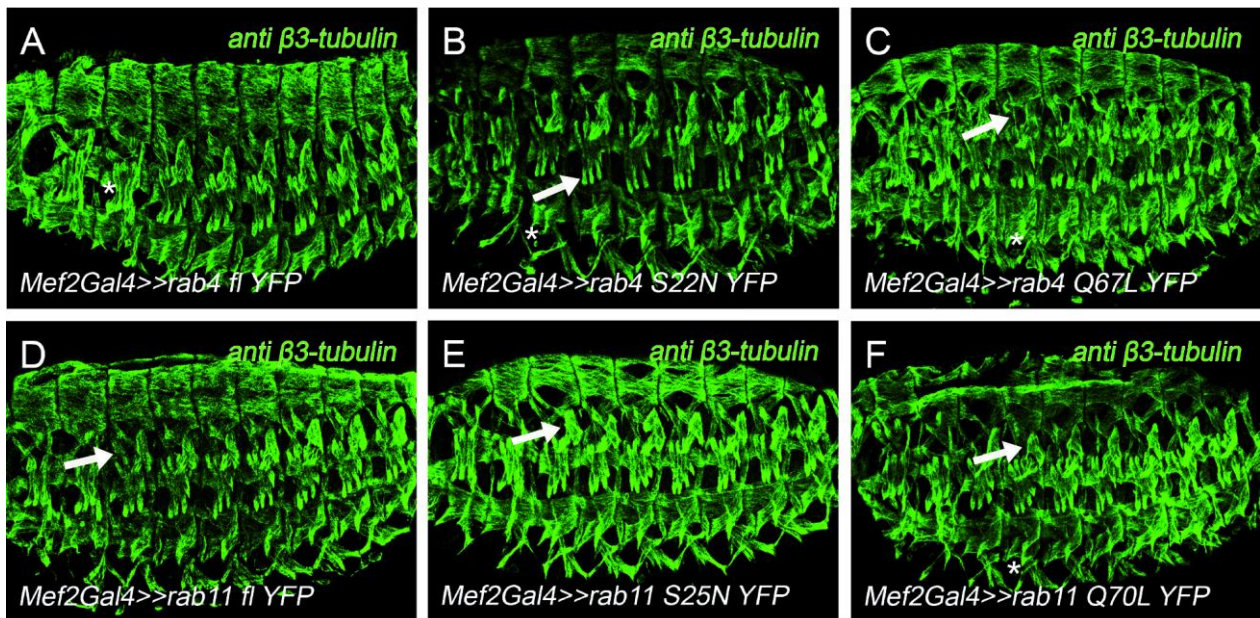
**Abb. 52: *marf*-Mutanten weisen einen starken Fusionsdefekt auf.** Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels eines muskelspezifischen  $\beta$ 3-TubulinAntikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. Im Wildtyp ist das gleichmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). In *milt*-Mutanten (B) fehlen vereinzelt Muskeln (Pfeilkopf) und die Muskeln erscheinen dünner im Vergleich zum Wildtyp. *marf*-Mutanten zeigen einen starken Fusionsdefekt.

Der Phänotyp von *marf*-Mutanten im Vergleich zu *milt*-Mutanten weist darauf hin, dass Marf eine Funktion während der Myoblasten Fusion haben könnte. Um das zu bestätigen, sollte der Phänotyp beider Mutanten näher charakterisiert werden.

### 3.7.11 Die Expression von konstitutiv-aktiven Rab4 und Rab11 führt zu Defekten während der Myoblastenfusion

Ras related in brain (Rab) Proteine gehören zur Gruppe der kleinen GTPasen und sind an der Regulierung der intrazellulären Dynamik beteiligt. Rab4 ist an der Endozytose und dem recyceln von Vesikeln des frühen Endosoms beteiligt. Rab11 ist am Recycling von Vesikeln zwischen dem Golgi und dem späten Endosom und der Membran beteiligt (Just und Peranen 2016). Interessant sind beide Proteine, da gezeigt werden konnte, dass sie eine Rolle in der Homöostase von Mitochondrien spielen. Rab4 ist an der Inhibition von Mitophagie beteiligt, indem es unter anderem für die Degradierung von Drp1 verantwortlich ist (Caza et al. 2014). Rab11 dagegen scheint an der Lokalisation von Drp1 zu den Mitochondrien eine Rolle zu spielen und damit die Verteilung von Mitochondrien zu Energie benötigenden Aktin-reichen Strukturen zu erleichtern (Landry et al. 2014). Um erste Hinweise auf eine Beteiligung von Rab4 und Rab11 während der Muskelentwicklung zu erhalten, wurde die Expression von Rab4 und Rab11 Fusionsproteinen, sowie dominant-negativ und konstitutiv-aktiven wirkenden Fusionsproteinen im *Mef2Gal4* Expressionsmuster untersucht. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-fl-YFP* führt zu einem sehr leichten Fusionsdefekt, bei dem vereinzelt unfusionierte FCM vorliegen (Abb. 53A,

Sternchen). In dominant-negativ wirkenden *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-S22N-YFP* Embryonen können ebenfalls wenigen unfusionierten FCM, sowie zu teilweise dünner ausgeprägten Muskeln (Pfeil) und vereinzelt konnten fehlende Muskeln beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigt die Expression von konstitutiv-aktiven *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-Q67L-YFP* den stärksten Phänotyp (Abb. 53C). Neben einigen unfusionierten FCM (Sternchen), scheinen die ventralen Muskeln ihre epidermale Anheftungsstelle nicht mehr zu erreichen (Pfeil) und einige der Muskeln sind dünner ausgeprägt (Pfeilkopf). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-fl-YFP* führt dazu, dass sich die lateralen Muskeln teilweise nicht richtig ausprägen (Abb. 53D, Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-S25N-YFP* getriebene Embryonen zeigen einen ähnlichen Phänotyp zu *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-fl-YFP* getriebenen Embryonen. Auch hier sind die lateralen Muskeln teilweise nicht richtig ausgeprägt (Abb. 53E, Pfeil). Die Expression eines konstitutiv-aktiven *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-Q70L-YFP* führt zu einem stärkeren Phänotyp als dies in *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-fl-YFP* und *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-S25N-YFP* getriebenen Embryonen beobachtet werden konnte. Neben der inkorrekten Ausbildung der lateralen Muskeln (Pfeil).



Eine Expression von konstitutiv-aktiven Rab4 und Rab11 führt zu einem leichten Defekt in der Muskelentwicklung. Die Muskulatur von Stadium 16 Embryonen wurden mittels eines muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Anterior links, posterior rechts. *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-fl-YFP* getriebene Embryonen weisen vereinzelt unfusionierten FCM auf (A, Sternchen).

Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-S22N-YFP* führt zu teilweise dünner ausgeprägten Muskeln (B, Pfeil). In *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-Q67L-YFP* getriebenen Embryonen sind vereinzelt unfusionierten FCM (C, Sternchen), teilweise dünner ausgeprägten Muskeln zu beobachten (Pfeil). *Mef2-Gal4>>UAS-rab4-Q67L-YFP* getriebene Embryonen weisen einigen unfusionierten FCM (Sternchen) auf und die ventralen Muskeln scheinen ihre epidermale Anheftungsstelle nicht mehr zu erreichen (Pfeil). Einige der Muskeln sind dünner ausgeprägt (Pfeilkopf). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-fl-YFP* führt dazu, dass lateralen Muskeln teilweise nicht richtig ausgeprägt sind (D, Pfeil). In *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-S25N-YFP* sind die lateralen Muskeln nicht richtig ausgeprägt (E, Pfeil). Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-Q70L-YFP* führt zu einer fehlerhaften Ausbildung der lateralen Muskeln (Pfeil).

Die Ergebnisse lassen darauf, schließen, dass sowohl Rab4 als auch Rab11 eine Funktion während der Myogenese einnehmen könnten. Ob die Funktion, ähnlich wie dies in Vertebraten Zellen bereits gezeigt werden konnte, mit der Regulierung von Drp1 zusammen hängt, ist noch unbekannt. Da weder Rab4 noch Rab11 ausschließlich für die Regulierung von Drp1 verantwortlich sind, besteht die Möglichkeit, dass ihre Funktion im recycling Endosom eine Rolle während der Myoblastenfusion spielt.

## 4 Diskussion

Die Zell-Zell Fusion ist ein essentieller Schritt während der Entwicklung der somatischen Muskulatur in *Drosophila melanogaster*. Dabei fusionieren während der embryonalen Entwicklung FC und FCM um die larvalen Muskeln zu bilden. Am Zell-Zell Kontakt entsteht nach Erkennung und Anheftung dieser eine Zellkommunikationsstruktur, die Fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS) (Dissertation Kesper et al. 2007; Masterarbeit Papendieken 2013; Onel und Renkawitz-Pohl 2009). Diese weist deutliche Ähnlichkeit zu der immunologischen Synapse auf (IS), welche zwischen einer T-Zelle und einer Antigen-präsentierenden Zelle ausgebildet wird (Dustin et al. 1998). Während des Fusionsprozesses von FC und FCM lassen sich auf ultrastruktureller Ebene zwei unterschiedliche elektronendichte Strukturen erkennen, dabei handelt es sich um elektronendichte Plaques und Vesikel. Die Funktion der elektronendichten Vesikel konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Ein für die Fusion essentielles Protein ist Blow. Auffällig ist, dass es in *blow*-Mutanten zu einer Akkumulation von elektronendichten Vesikeln kommt. Zudem stoppen diese sehr früh während der Entwicklung. Dies legt die Vermutung nahe, dass Blow direkt oder indirekt an dem Prozess der Rekrutierung der Vesikel beteiligt sein könnte. Zudem ist für Blow eine Rolle während der Reorganisation des F-Aktin Zytoskeletts beschrieben worden. Dabei konkurriert das FCM-spezifisch exprimierte Blow mit Wasp um die Bindung an Wip, wodurch es zu einer modellierten Arp2/3-Komplex Aktivierung kommt. Dies führt zur Bildung von Finger-ähnlichen F-Aktin Strukturen am Zellkontakt auf Seiten der FCM (Jin et al. 2011). Ein bereits während der Masterarbeit (Masterarbeit Papendieken, 2013) durchgeführter Hefe-2-Hybrid Screen nach potentiellen Blow Interaktionspartnern sollte weitere Hinweise darüber geben, welche molekulare Komponente an der Akkumulation von elektronendichten Vesikeln an der Plasma Membran beteiligt ist.

Es konnte auch gezeigt werden, dass Blow in der Lage zu sein scheint mit sich selbst zu interagieren (Masterarbeit Papendieken 2013, Giot et al. 2003). Dies konnte bis jetzt außerhalb des Hefe-2-Hybrid Systems noch nicht bestätigt werden, liefert jedoch Hinweise darauf, dass Blow möglicherweise als Dimer agieren könnte. Eines weiterer der durch den Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten potentiellen Interaktionspartner ist die Tyrosinkinase Shark. Das Vertebraten Homolog von Shark ist zusammen mit Swip-1 an der Aktivierung der IS beteiligt (Krocze et al. 2010). In *Drosophila* konnte kürzlich gezeigt werden, dass Shark zusammen mit

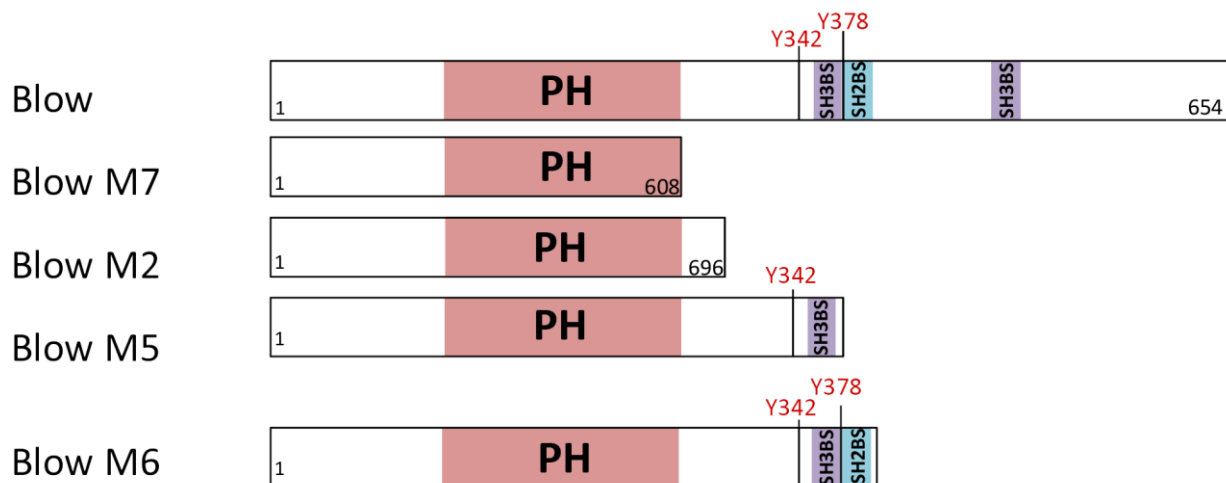
DSwip-1 am Zellkontakt während der Myoblastenfusion lokalisiert (Freitag 2013). Ein Verlust von DSwip-1 führt zudem zu einer veränderten Lokalisation von Shark und in *sns*-Mutanten lokalisiert DSwip-1 nicht mehr am Zellkontakt. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Shark und DSwip-1 sowie zwischen Shark und Sns im Split-YFP als auch im Hefe-2-Hybrid System *in vivo* stattfindet (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013; Masterarbeit Fritzen 2013). Diese Daten weisen auf eine Beteiligung von Shark an der Myoblastenfusion hin und machen Shark zu einem interessanten potentiellen Interaktionspartner von Blow. Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit die Beziehung zwischen Blow und Shark charakterisiert werden, um weitere Einblicke in die Regulation beider während der Reorganisation des F-Aktin Zytoskeletts zu erhalten.

Ein weiterer, über den Hefe-2-Hybrid Screen, identifizierter potentieller Interaktionspartner von Blow ist das mitochondriale Regulator Protein Drp1. Es ist allgemein an der Regulation der mitochondriellen Teilung beteiligt, außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Drp1 an der Relokalisation von Mitochondrien in der neurologischen als auch immunologischen Synapse (Denker und Rizzoli 2010; Kummerow et al. 2009; Quintana et al. 2007; Vos et al. 2010). Daher wird im zweiten Teil dieser Arbeit die Interaktion zwischen Blow und Drp1 näher betrachtet. Es soll die Frage geklärt werden, ob Drp1 während der Myoblasten Fusion involviert ist. Des Weiteren stellt sich die Frage ob Blow und Drp1 unabhängig von der Regulation der Mitochondrien eine Rolle während der Fusion einnehmen oder ob Drp1 über die Relokalisation der Mitochondrien am Zellkontakt wirkt.

#### **4.1 Essentielle Domänen für die Funktion von Blow während der Zell-Zell Fusion**

Ein Verlust von Blow führt zu einem Stopp der Fusion, sowie einer Akkumulation von elektronendichten Vesikel in der Nähe des Zell-Zell Kontaktes (Doberstein et al. 1997). Blow lokalisiert Sns-abhängig nach erfolgreicher Adhäsion am Zell-Zell Kontakt (Jin et al. 2011; Kesper et al. 2007). Es stellt sich die Frage wie Blow zum Zell-Zell Kontakt rekrutiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Blow mit dem SH2-SH3 Adapterprotein Crk über dessen SH2-Domäne sowie mit der ersten SH3-Domäne interagiert, wobei der Austausch der potentiellen Phosphorylierungsstelle Y378 zu Y378A oder Y378F in Blow zu einem Verlust der

Interaktion führt (Jin et al. 2011). Allerdings existiert bis jetzt noch keine Mutante für Crk, da es auf dem 4. Chromosom lokalisiert ist, was die Generierung von Mutanten und somit den Nachweis einer genetischen Interaktion zwischen Blow und Crk erschwert (Galletta et al. 1999). In Rettungsexperimenten konnten eine Rettung nur mit wildtypischen Blow, jedoch nicht mit BlowY378F von *blow*-Mutanten erreicht werden (Jin et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass die Rekrutierung von Blow zum Zell-Zell Kontakt Crk-abhängig stattfinden könnte. Beim Rekrutierungsprozess scheinen die potentiellen Phosphorylierungsstellen von Blow eine Rolle zu spielen (Jin et al. 2011; Kim et al. 2007). In dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Blow-Deletionen ermittelt werden, welche Domänen essentiell für die Fusion sind und ob weitere für die Fusion relevante phosphorylierte Tyrosine vorliegen (Abbildung 53) zeigt alle untersuchten Blow-Deletionen). Bisher konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Y378 von Blow essentiell für die Myoblastenfusion ist, da die Expression von Blow-Y378D in *blow*-Mutanten den *blow*-Phänotyp nicht retten kann (Jin et al. 2011). Allerdings existiert in Blow noch ein weiteres Tyrosin (Y342), welches potentiell phosphoryliert werden kann. Des Weiteren besitzt Blow eine PH-Domäne, die wichtig für die Membranrekrutierung sein könnte.



**Abb. 53: Schematische Übersicht über die Blow Protein-Domänen.** Alle verwendeten *blow*-Deletionskonstrukte. Blow M7 enthält den N-terminalen Bereich einschließlich der PH-Domäne. Blow M2 ist zusätzlich 29 Aminosäuren länger als Blow M7. Bei Blow M5 und Blow M6 sind zusätzlich noch die potentielle Phosphorylierungsstelle Y342 und die erste SH3 BS enthalten und Blow M6 enthält die SH2 BS und die Phosphorylierungsstelle Y378.



Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M7-myc* in Embryonen zeigt einen schwachen Phänotyp mit dünner wirkenden Muskeln (siehe Abb. 1C), wobei diese nur die PH-Domäne enthalten. Interessanterweise zeigen *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M2-myc* exprimierende Embryonen den stärksten Phänotyp, wobei diese sich nur in 29 Aminosäuren nach der PH-Domäne unterscheiden. Dieser Bereich enthält weder die Phosphorylierungsstelle Y378 noch die potentielle Phosphorylierungsstelle Y342. In den Embryonen konnten einige unfusionierte FCMs sowie fehlende Muskel beobachtet werden. Des Weiteren scheint ein Defekt in der epidermalen Anheftung vorzuliegen. Wichtig wäre es auch zu untersuchen inwieweit die Deletionsproteine und insbesondere Blow-M2-Myc noch am Zell-Zell Kontakt während des Fusionsprozesses lokalisieren können. Dafür können die Deletionsproteine mittels eines gegen Myc gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden. Die PH-Domäne ist durch ihre Struktur charakterisiert, welche aus 7 $\beta$  und einer  $\alpha$  Helix besteht. Sie ist dafür bekannt Proteine über Phosphoinositole an die Membran zu binden. (DiNitto und Lambright 2006; Lemmon et al. 1996; Moravcevic et al. 2012). Proteine werden dabei zu Bereichen der Membran rekrutiert welche Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) enthalten (Balla 2005). PH-Domänen Proteine können allerdings auch über die Bindung an guanin nukleotid bindende Proteine (Cohen et al. 2007; Mott und Owen 2015) und SH3-Domänen Proteine gezielt rekrutiert werden (Hwang et al. 2007). Bislang ist zu der Funktion der PH-Domäne in Blow nichts bekannt. Da Blow allerdings ein cytoplasmatisch exprimiertes Protein ist, welches während des Fusionsprozesses zur Zell-Zell Kontaktstelle rekrutiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die PH-Domäne für die Rekrutierung oder die lokale Positionierung mitverantwortlich sein könnte (Kesper et al. 2007). Um heraus zu finden inwieweit die PH-Domäne dabei involviert ist, wäre die Expression eines Deletionsproteins sinnvoll welchem die PH-Domäne fehlt. Bei der Annahme, dass dies zu einem Fusionsdefekt führen, würde es Hinweise auf eine Beteiligung dieser an der Lokalisation von Blow liefern. Allerdings können auch Motive außerhalb einer PH-Domäne an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> binden. Dies konnte beispielweise für das neuronale-Wasp (N-Wasp) gezeigt werden, wo es an das B-Motiv in N-Wasp bindet (Papayannopoulos et al. 2005). Interessant wäre es zu untersuchen, ob in den 29 Aminosäuren Unterschied zwischen dem Deletionskonstrukt M7 und M2 von Blow, möglicherweise ein PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-bindendes Motiv liegt. Dies könnte den stärkeren Phänotyp von *Mef2-Gal4>>UAS-blow-M2-myc* exprimierenden Embryonen erklären.



Jin et al. (2011) konnten eine Interaktion von Blow mit dem SH2-SH3-Domänen Protein Crk zeigen. Wobei die Interaktion sowohl mit der SH2-Domäne als auch mit der ersten SH3-Domäne seitens Crk und einer einzigen YDVP Sequenz seitens Blow, welche dem SH2-Bindemotiv entspricht, vermittelt wird (Jin et al. 2011; Pawson et al. 2001). Des Weiteren wurde für Crk postuliert, dass es an der Rekrutierung von Wip zum Zell-Zell Kontakt beteiligt ist (Kim et al. 2007). Da Blow am Zell-Zell Kontakt wirkt wäre eine Rekrutierung von Blow durch Crk möglich (Jin et al. 2011). Es ist noch nicht genau geklärt wie Blow zum Zell-Zell Kontakt lokalisiert wird und bleibt. Denkbar wäre sowohl eine Rekrutierung durch Crk an den Sns-Rezeptor und anschließende PI(3,4,5)P<sub>3</sub> abhängige Membran Rekrutierung. Zunächst einmal sollte allerdings für alle im Embryo exprimierten Deletionen von Blow (M2-M7) einschließlich einem *blow fl*-Konstrukt als Kontrolle untersucht werden, ob diese in der Lage sind den *blow*<sup>2</sup>-Mutanten Phänotyp zu retten um eine genauere Aussage über die Wirkung der einzelnen Bereiche von Blow machen zu können. Allerdings konnte in einem globalen Hefe-2-Hybrid Screen mit einer embryonalen Bibliothek (Masterarbeit Papendieken 2013) Crk nicht als potentieller Interaktionspartner für Blow identifiziert werden, obwohl eine Interaktion beschrieben wurde (Jin et al. 2011). Möglicherweise muss für eine Interaktion eine Modifikation von Blow erfolgen, welche im Hefesystem meist nicht stattfinden können, wie beispielsweise Tyrosinphosphorylierungen. SH2 Domänen können phosphorylierte Tyrosine binden (Pawson et al. 2001; Stynen et al. 2012).

Auch wenn Jin et al., (2011) eine Funktion während der F-Aktin Reorganisation für Blow nachweisen konnten, bleibt dennoch die Frage offen welche Rolle die elektronendichten Vesikel spielen. Ultrastrukturelle Analysen weiterer an der Fusion beteiligter Proteine weisen darauf hin, dass Blow möglicherweise nicht nur an der F-Aktin Reorganisation beteiligt ist. *blow*-Mutanten stoppen auf ultrastruktureller Ebene bei der Etablierung des Präfusionskomplexes (Doberstein et al. 1997). Betrachtet man dazu im Vergleich *wip*- und *wasp*-Mutanten, welche erst während der Vesikularisierung der Membranen am Zell-Zell Kontakt die Fusion stoppen, ist dies ein erster Hinweis auf eine mögliche frühere Funktion von Blow während des Fusionsprozesses (Berger et al. 2008; Massarwa et al. 2007). Allerdings wurde auch Wip nicht im Hefe-2-Hybrid Screen entdeckt (Masterarbeit Papendieken 2013). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Blow mit Wip eine direkte Protein Interaktion eingeht. Dafür entscheidend scheinen sowohl die N- als auch C-terminale Region von Blow zu sein (Jin et al. 2011). In Wildtyp-Embryonen bildet sich

während der Fusion ein F-Aktin Fokus in FCMs am Zell-Zell Kontakt aus. Der Durchmesser des F-Aktin Fokus ist in *blow*-Mutanten vergrößert (Richardson et al. 2007). Ob die F-Aktin Reorganisation in den Blow-Deletionen beeinträchtigt ist könnte eine Phalloidin Färbung zeigen. Dazu müssen die Deletionskonstrukte im *blow*-Mutanten exprimiert werden.

## 4.2 Die nRTK Shark ist an der Myogenese beteiligt und scheint genetisch mit Sns zu interagieren

Die nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Shark wurde in zwei unabhängigen Arbeiten identifiziert und charakterisiert (Dissertation Freitag 2013; Masterarbeit Papendieken 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Shark, basierend auf einem globalen Hefe-2-Hybridscreen, als potentieller Interaktionspartner von Blow untersucht (Masterarbeit Papendieken 2013). Das Säugetier Homolog zu Shark ist die Spleen Tyrosin Kinase (Syk), welche ebenfalls zwei SH2-Domänen sowie eine Kinasedomäne aufweist. Shark besitzt zusätzlich noch Ankyrin-ähnliche Wiederholungen zwischen beiden SH2-Domänen. Die Bereiche zwischen beiden SH2-Domänen wird als Interdomäne A bezeichnet und der Bereich zwischen zweiter SH2-Domäne und Kinase-Domäne als Interdomäne B (Mocsai et al. 2010). Syk spielt eine Rolle bei der Etablierung der Immunologischen Synapse (IS) in B-Zellen nach Erkennung eines spezifischen Antigens über den B-Zell Rezeptor (BCR) (Reth 1989). In Vertebraten erfolgt die Signalweiterleitung nach Antigenbindung des BCRs und hängt von der Phosphorylierung seiner Tyrosinreste im Ig  $\alpha/\beta$  ITAM Motif ab. Diese werden durch Kinasen der Src-Tyrosinkinase Familie phosphoryliert (DeFranco 1997). Syk wird daraufhin als eines der ersten Proteine zur Membran rekrutiert, wo es durch die phosphorylierten ITAM Motive des BCRs aktiviert wird. Syk ist im weiteren Verlauf für die Aktivierung anderer Signalproteine beteiligt unter anderem CD19, Plc $\gamma$ , Vav und  $\gamma$ BTK verantwortlich (Depoil et al. 2008; Sohn et al. 2008; Weber et al. 2008). Die Aktivität von Syk wird durch Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen bestimmter Tyrosinereste reguliert (Mocsai et al. 2010). So sind zehn Tyrosine bekannt, die entsprechende Stellen für Autophosphorylierungen darstellen und eine Rolle während der Signaltransduktion spielen (Furlong et al. 1997). Für die Weiterleitung des Signals sind dabei sowohl die Kinase-Domäne als auch beide SH2-Domänen erforderlich. Die Kinase-Domäne liegt normalerweise inaktiv vor und kann durch Bindung beider SH2-Domänen an sogenannte ITAMs (phosphorylierten

immunreceptor-tyrosin-based-activation-motif) des BCRs aktiviert werden. Möglich ist dies ebenfalls über multiple Phosphorylierungen der Interdomäne A und B, selbst wenn keine phosphorylierten ITAMs vorliegen (Tsang et al. 2008). Ob die Regulierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen in *Drosophila* Shark während der Myoblastenfusion ähnlich wichtig ist, wie dies für Syk gezeigt werden konnte, ist unklar. Daher wurde stark konservierten Tyrosin-Reste in Shark genauer untersucht. Dabei wurde der Fokus auf die potentiellen Phosphorylierungsstellen Y222, Y631, Y821 und Y927 gelegt (assoziierte Bachelorarbeit zu dieser Arbeit Julia Winkelmann 2016). Die Stelle Y222 ist dabei zwar nicht konserviert, wurde aber als potentielle Phosphorylierungsstelle vorhergesagt (PhosphoBase: Kreegipuu et al. 1999). An den entsprechenden Stellen wurde ein Aminosäure-Austausch vorgenommen. Dabei wurde das Tyrosin einmal zur Asparaginsäure (D) oder zu Phenylalanin (F) ausgetauscht, um so ein phosphoryliertes (phosphomimetic) oder nicht-phosphorylierbares (phospho-mutant) Tyrosin vorzutauschen. Die Expression dieser modifizierten Proteine in Embryonen, führte zu keinen auffälligen Veränderungen während der Myoblastenfusion. Alle Proteine lokalisierten ebenfalls, wie dies für den Wildtyp gezeigt wurde, am Zell-Zell Kontakt (Bachelorarbeit Winkelmann 2016; Masterarbeit Fritzen 2013). Interessant wäre es zu untersuchen, ob ähnlich wie dies für Sns gezeigt werden konnte, der Austausch mehrerer Tyrosine notwendig ist, um die Aktivierung von Shark zu unterbinden (Kocherlakota et al. 2008). Damit könnte die Frage beantwortet werden, ob Shark ähnlich wie Syk reguliert wird und ob die Aktivierung von Shark einen Einfluss auf den Fusionsprozess hat (Mocsai et al. 2010). Allerdings könnte es auch sein, dass ein essentieller Prozess wie die Signalweiterleitung am Zell-Zell Kontakt durch funktionelle Redundanzen gesichert wird. Für funktionelle Redundanzen während der Myoblastenfusion gibt es bereits einige Beispiele. So wirken die Adhäsionsproteine Duf/Kirre und Rst/IrreC (Strunkelnberg et al. 2001) in Redundanz zueinander und für Sns und Hbs konnte eine partielle funktionelle Redundanz gezeigt werden (Shelton et al. 2009). Auch die kleinen GTPasen Rac1 und Rac2 können jeweils die Funktion des jeweils anderen übernehmen (Hakeda-Suzuki et al. 2002).

Eine Sequenzierung des Shark Klons aus der Hefe-2-Hybrid Datenbank des Screens weist darauf hin, dass die Interaktion auf der Kinasedomäne von Shark zu beruhen scheint (Masterarbeit Papendieken 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Kinasedomäne von Shark die Interaktion vermittelt oder ob weitere Bereiche dafür wichtig sind. Außerdem wurde untersucht welche Bereiche auf Seiten von Blow die Interaktion mit Shark

vermitteln. Die Interaktion zwischen Blow und Shark konnte zwar mittels des Hefe-2-Hybridscreens im Einzeltest bestätigt werden, es konnte allerdings kein, essentieller Bereich für die Vermittlung der Interaktion auf Seiten von Shark und Blow bestimmt werden. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Kinasedomäne von Shark während der Myoblastenfusion eine Rolle spielt. Es wurde eine Shark-Deletion mit fehlender Kinasedomäne erstellt und in den *Drosophila* Expressionsvektor pUAS<sub>t</sub> eingebracht. Mit Hilfe der Mef2-Gal4 Treiberlinie, welche ab dem Stadium 11 die Expression von *UAS-shark Δ kin-mcherry* in allen Myoblasten anschaltet, wurde die Rolle der Kinase-Domäne untersucht. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* führt lediglich zu vereinzelt vorliegenden FCMs. Ein βPS2-Integrin Nachweis zeigt, dass die Muskeln auch ihre epidermale Anheftungsstelle erreichen. Eine Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* im *shark<sup>1</sup>*-Mutanten Hintergrund ist notwendig, um ausschließen zu können, dass aufgrund des endogen vorliegenden Shark-Proteins Defekte in der Myogenese nicht sichtbar sind. Immunhistologische Daten weisen darauf hin, dass Shark ähnlich wie Blow FCM spezifisch exprimiert zu sein scheint und am Zell-Zell Kontakt der FCM als Foci lokalisiert (Masterarbeit Fritzen 2013). Aus dieser und weiteren Arbeiten ist außerdem bereits bekannt, dass der Verlust von Shark in *shark<sup>1</sup>*-Mutanten zu keinem Fusionsdefekt führt (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). *in situ*-Hybridisierungen mit einer *shark*-RNA in Oozyten weisen auf eine maternale Komponente hin (Tran und Berg 2003). Diese könnte ausreichen um eine normale Myogenese zu ermöglichen. Zudem war es bis jetzt nicht möglich eine Rekombinante für Blow und Shark zu generieren, welche weiteren Aufschluss darüber geben könnte, ob eine genetische Interaktion vorliegt. Aus Vertebraten ist bekannt, dass entweder die Deletion beider SH2-Domänen oder der Ank Wiederholungen von Shark zu einer Aktivierung des Proteins führt (Rolli et al. 2002). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ 2SH2-mcherry* und *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ Ank-myc* in Embryonen exprimiert. *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ 2SH2-mcherry* exprimierenden Embryonen weisen keulenförmig ausgeprägte Muskeln auf sowie einige unfusionierte FCMs. Im Gegensatz dazu zeigen *Mef2-Gal4>>UAS-shark Δ Ank-myc* exprimierenden Embryonen einen deutlich stärkeren Phänotyp. Der Keimstreifrückzug ist in einigen Embryonen gestört und sie weisen eine deutlich verzögerte Entwicklung auf. Andere weisen ein stark ungeordnetes Muskelmuster mit einigen unfusionierten FCMs auf. Die in beiden getriebenen Fliegenlinien vorkommenden

keulenförmigen ausgeprägten Muskeln weisen auf einen Anheftungsdefekt hin. Dieser muss noch über ein  $\beta$ PS2-Integrin Nachweis bestätigt werden, da die Anheftung von Integrin abhängig ist. Ob diese Phänotypen auf ein potentiell als konstitutiv-aktiv wirkendes Protein zurück zu führen sind, wie dies bereits für Vertebraten beschrieben wurde, kann anhand der Expressionsphänotypen nicht eindeutig gesagt werden. Deutlich wird allerdings das beide Proteindomänen, die Ank Wiederholungen und beide SH2-Domänen, sehr wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen während der Myoblastenentwicklung einzunehmen scheinen. Um näher zu charakterisieren, ob die Deletionen tatsächlich konstitutiv-aktiv wirken, müsste sich der Phänotyp über das Einkreuzen der *shark<sup>l</sup>*-Mutation oder einer *shark*-Defizienz abschwächen lassen. Diese Experimente stehen noch aus. Interessanterweise weisen *csk*, *shark<sup>l</sup>*-Mutanten Anheftungsdefekte der Muskeln auf. Eine  $\beta$ PS2-Integrin Antikörperfärbung scheint außerdem darauf hinzuweisen, dass weniger Integrin an den Anheftungsstellen vorhanden ist. Auch in *UAS-shark  $\Delta$  Ank mcherry* exprimierenden Embryonen konnten Anheftungsdefekte beobachtet werden (unveröffentlichte Daten, Stefanie Lübke). Das könnten erste Hinweise darauf sein, dass die beiden nRTK Shark und Csk möglicherweise bei dem Prozess der Muskelanheftung involviert sein könnten. Die Frage die sich hierbei stellt ist, ob auch Sns und Blow möglicherweise daran beteiligt sein könnten. Zunächst einmal sollte die veränderte Integrin Akkumulation an den *UAS-shark  $\Delta$  kin-mcherry*, *UAS-shark  $\Delta$  Ank mcherry* und *UAS-shark  $\Delta$  2SH2-mcherry* exprimierenden Embryonen bestätigt werden und eventuell quantitativ ausgewertet werden. In Vertebraten bindet Syk in Blutblättchen an eine Untereinheit von  $\beta$ 3-Integrin, der  $\alpha$ Iib Kette ähnlich der aus anderen Proteinen mit einem ITAM Motiv. Dabei ist die Interaktion, anders als die Interaktion zwischen Syk und dem ITAM Motiv nicht von der Phosphorylierung der Tyrosinreste von  $\beta$ 3-Integrin abhängig. Auch erfolgt keine direkte Aktivierung von Syk (Woodside et al. 2001). Weitere Daten aus Osteoclasten weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Syk tatsächlich auf die Assoziation mit ITAM Immunrezeptoren zu beruhen scheint (Zou et al. 2007). Nicht nur Syk ist in hematopoietischen Zellen mit  $\beta$ 3-Integrin ( $\alpha$ Iib  $\beta$ 3-Integrin) assoziiert, Src und seine regulatorische Kinase Csk ebenfalls. Csk dissoziiert von  $\beta$ 3-Integrin und Src wird aktiviert. Aktiviertes Src ist dabei wichtig für die  $\alpha$ Iib  $\beta$ 3-abhängige Phosphorylierung von Syk (Oberfell et al. 2002). Diese Daten sowie die Ergebnisse der Expressionsstudien in *Drosophila* liefern Hinweise, dass Shark möglicherweise auch eine Rolle bei dem Anheftungsprozess der Muskeln an ihre epidermale Anheftungsstelle involviert sind.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht welche Bereiche von Shark und Blow für die Vermittlung der Interaktion verantwortlich sind. Dazu wurde Deletionen von Shark und Blow mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems in Hefen exprimiert und auf Interaktion miteinander untersucht. Es konnten gezeigt werden, dass auf Seiten von Shark alle getestete Deletionskonstrukte mit Blow interagieren (Shark  $\Delta$  kin, Shark kin 1, Shark kin 2, Shark kin, shark  $\Delta$  N-term, Shark Ank, Shark Inter B). Auf Seiten von Blow interagierte nur das volle-länge Blow, nicht jedoch Blow  $\Delta$  N-term oder Blow  $\Delta$  C-term. Da Blow auch als potentieller Interaktionspartner im globalen Blow Hefe-2-Hybrid Screen identifiziert wurde, könnte es möglicherweise als Dimer agieren (Masterarbeit Papendieken 2013; Giot et al. 2003). Zur weiteren Verifizierung der Interaktion wurde eine Co-Immunoprecipitation von beiden Proteinen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis von Shark-eGFP war dabei schon in den Kontrollexperimenten nicht möglich, weshalb das Experiment mit einem anderen Shark-Fusionsprotein nochmal durchgeführt werden sollte. Shark lokalisiert in *Drosophila* Myoblasten FCM-spezifisch am Zell-Zell Kontakt, wobei jedoch nicht bekannt ist wie es zum Fusionsort gelangt, was die Frage aufwirft wie Shark an die Membran rekrutiert wird (Masterarbeit Fritzen 2013). Erste Hinweise zeigen auf, dass die Lokalisation von Shark von dem EF-hand Domänen Protein DSwip-1 abzuhängen scheint, da es zu einer veränderten Lokalisation von Shark in Dswip-1-Mutanten kommt und beide Proteine am Zell-Zell Kontakt coexprimiert vorliegen (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). Bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC Assay) Daten zeigen, dass es in FCMs exprimiert wird. Es liegen ebenfalls Hinweise vor, dass DSwip-1 in Abhängigkeit von seinen EF-hand-Domänen sowie der coiled-coil-Domäne Membran-assoziiert in FCMs vorliegt. Das legt die Vermutung nahe, dass DSwip-1 möglicherweise an der Rekrutierung von Shark zur Membran beteiligt sein könnte. Interessanterweise ist die Lokalisation von Shark in *sns*<sup>20-5</sup>-Mutanten, in denen die intrazelluläre Domäne fehlt, gestört. BiFC Experimente zeigen eine Interaktion zwischen DSwip-1 und dem Zelladhäsionsmolekül Sns. Das unterstützt die Theorie, dass DSwip-1 Shark zum Zell-Zell Kontakt rekrutiert wird (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). Aus Vertebraten ist außerdem bekannt, dass das Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protein Swip Ca<sup>2+</sup> über seine beiden EF-hand-Domänen binden kann (Vega et al. 2008). In B-Zellen wurde gezeigt, dass das Säugetier Homolog von Shark Syk durch Swip-1 an die Plasmamembran rekrutiert wird und dort zusammen mit der Src-Kinase Lyn den BCR phosphoryliert (Kroczeck et al. 2010; Rolli et al. 2002). Basierend darauf wird vermutet, dass die

Rekrutierung von Shark in *Drosophila* über DSwip-1 erfolgt, wo es das IgSF-Protein Sns phosphorylieren könnte (Dissertation Hornbruch-Freitag 2013). Denn es konnte bereits gezeigt werden, dass Sns nicht nur während des Fusionsprozesses phosphoryliert wird, sondern dass die Phosphorylierung der Zytodomäne von Sns essentiell während der Myoblastenfusion ist. Dabei scheint die mehrfache Phosphorylierung der Tyrosine und nicht der Serine entscheidend zu sein. Die Expression eines Konstruktes, bei dem 14 Tyrosine fehlen, konnte *sns*-Mutanten nicht mehr retten (Kocherlakota et al. 2008). Daher wurde die Beziehung zwischen Shark und Sns weiter untersucht. Eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen Shark und Sns, sowie Shark und Sns intra, welchem die intrazelluläre Domäne fehlt, konnte im Hefe-2-Hybridsystem nicht bestätigt werden. In Hefen finden zwar häufig keine Phosphorylierungen statt, da allerdings Shark als Kinase eigenständig in der Lage sein sollte die Zytodomäne von Shark zu phosphorylieren, sollte der Faktor vernachlässigbar sein (Bruckner et al. 2009). Allerdings ist nicht bekannt, ob zusätzliche Faktoren dafür benötigt werden. Die in Hefen exprimierten Proteine werden in den Nukleus transportiert, ist dort das Umfeld ungeeignet für eine Phosphorylierung oder reicht die Zeit der Interaktion, wenn diese nur während des Phosphorylierungsprozess stattfindet, nicht aus um die Genexpression ausreichend zu aktivieren, könnte dies erklären warum keine Interaktion mit Sns nachweisbar ist. Eine Co-Immunopräzipitation könnte da eine geeignetere Methode zum Nachweis einer Interaktion sein. Es wurde eine *shark<sup>l</sup>, sns<sup>20-15</sup>* Doppelmutante untersucht. Diese zeigt wie erwartet einen starken Fusionsdefekt, induziert durch den Verlust von Sns. In *sns<sup>+/-</sup>; shark<sup>-/-</sup>*-Embryonen ist der *shark*-Phänotyp verstärkt wenn eine Kopie *sns* fehlt. Das weist darauf hin, dass zwischen Shark und Sns eine genetische Interaktion zu bestehen scheint.

### 4.3 Die GTPase-Domäne von Drp1 scheint essentiell für die Interaktion von Drp1 und Blow zu sein

Die während der Myoblastenfusion beobachteten elektronen-dichten Vesikel richten sich an der Membran am Zell-Zell Kontakt zwischen FC und FCM aus und haben ihren Ursprung am Golgi-Apparat (Kim et al. 2007). Dort sind sie häufig mit Mikrotubuli assoziiert, was einen Mikrotubuli vermittelten Transport vom Golgi-Apparate zur Fusionsstelle vermuten lässt (Kim et al. 2007). Doberstein et al. (1997) vermutete, dass die elektronen-dichten Vesikel mit der

Membran fusionieren und auf diese Art und Weise die elektronen-dichten Plaques entstehen. Allerdings wurden elektronen-dichte Vesikel auch in der Nähe von Plaques beobachtet, was drauf hinweisen könnte, dass diese wahrscheinlich getrennt voneinander vorkommen (Onel et al. 2014). Denkbar wäre auch, dass sie ein Fusogen an die Membrankontaktstelle bringen, wie dies beispielsweise für das Fusogen Eff-1 in *C. elegans* gezeigt werden konnte (Smurova und Podbilewicz 2016). Für Blow konnte zwar gezeigt werden, dass es eine Rolle bei der F-Aktin Reorganisation spielt, aber ein Verlust von Blow in *blow*-Mutanten führt zur Akkumulation von elektronen-dichten Vesikeln (Doberstein et al. 1997; Jin et al. 2011). Außerdem stoppen *wasp*- und *wip*-Mutanten während der Membranfusion bei der Vesikularisierung der Membranen und nicht wie *blow*-Mutanten vor der Fusion der Membranen während der Bildung des Präfusionskomplexes (Berger et al. 2008; Doberstein et al. 1997; Massarwa et al. 2007). Der während eines Hefe-2-Hybrid identifizierte potentielle Interaktionspartner Drp1 könnte weiter Aufschluss darüber geben, welche Aufgabe Blow während der Fusion besitzen könnte (Masterarbeit Papendieken 2013). Die Interaktion zwischen Blow und Drp1 konnte über einen Interaktionstest mittels des Hefe-2-Hybridsystems bestätigt werden. Das Dynamin-verwandte Protein Drp1 ist ein evolutionär konservierter Hauptregulator der mitochondrialen Teilung (Schrader 2006). Es ist ähnlich wie Dynamin eine multidomänen GTPase, welche aus einer GTPase-Domäne, einer mittleren Aufbau-Domäne (MD), einer B-Domäne unbekannter Funktion und einer GTPase Effektor-Domäne (GED) besteht (van der Blik 1999). Um zu bestimmen welche Domäne von Drp1 die Interaktion mit Blow vermittelt, wurden zwei Deletionskonstrukte von Drp1 erstellt und in Hefen exprimiert. Die Co-Expression von *blow fl pGBKT7* und *drp1 Δ GED pGADT7*, nicht jedoch von *blow fl pGBKT7* und *drp1 Δ GTPase pGADT7* zeigte eine Interaktion in Hefen. Dies weist darauf hin, dass die GTPase-Domäne von Drp1 essentiell für die Vermittlung der Interaktion zwischen Blow und Drp1 zu sein scheint. Die Deletion des C- oder N-terminalen Bereichs von Blow führt zum Verlust der Interaktion mit Drp1. Für die Interaktion scheint das vollständige Protein benötigt zu werden. Der Verlust von Drp1 in *Drosophila*-Embryonen führt zu einem sehr leichten Fusionsdefekt mit vereinzelt unfusioniert vorliegenden FCM (Dissertation Braukmann 2016). Zusätzlich zu dem bereits untersuchten *drp1<sup>1</sup>* Allel wurde auch *drp1<sup>2</sup>* untersucht, welches einen vergleichbaren Phänotyp zeigt. Beide Allele sind semilethal und es schlüpfen vereinzelt Fliegen (Verstreken et al. 2005). Eine *in situ*-Hybridisierung von Wildtyp-Embryonen zeigt eine starke maternale Komponente von Drp1



im syncytialen Blastoderm der Embryonen. Möglich ist, dass diese ausreicht um die Entwicklung der Muskulatur zu sichern. Keimbahnklone von Drp1 könnten Aufschluss darüber geben, ob Drp1 eine essentielle Funktion während der Fusion einnimmt. Es wurde früher bereits gezeigt, dass die maternale Komponente ausreichen kann um den Fusionsprozess zu gewährleisten auch wenn eine Defizienz für das Protein vorlag, wie dies Anhand von Wasp gezeigt werden konnte (Ben-Yaacov et al. 2001). Hier stellt sich die Frage, inwieweit Drp1 und Blow zusammen während der Myoblastenfusion eine Funktion einnehmen. Um darauf einen Hinweis zu erhalten wurde eine *blow*<sup>2</sup>, *drp1*<sup>1</sup>-Doppelmutante etabliert. Diese weist einen variablen Phänotyp auf, bei dem einige Embryonen einen *blow*-ähnlichen Fusionsdefekt und andere einen deutlich abgeschwächten Fusionsdefekt aufweisen. Homozygote *drp1*<sup>1</sup>-Mutanten denen eine Kopie von *blow*<sup>2</sup> fehlt weisen einen Fusionsdefekt auf, der sich deutlich von homozygoten *drp1*<sup>1</sup>-Mutanten unterscheidet. Dies liefert erste Hinweise, dass zwischen Blow und Drp1 eine genetische Interaktion während der Myoblastenfusion vorliegt. Die Verstärkung des Phänotyps muss noch mittels Kernzählungen bestätigt werden. Hierbei würde man eine verringerte Kernanzahl in den Myotuben der *drp1*<sup>1</sup>/*drp1*<sup>1</sup>; *blow*<sup>2</sup>/+-Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen erwarten. Bislang ist unklar welche Funktion Drp1 während der Myoblastenfusion haben könnte. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit verschiedene Deletionskonstrukte von Drp1 in *Drosophila*-Myoblasten exprimiert.

#### 4.4 Eine Relokalisation von Mitochondrien spielt in einigen zellulären Prozessen eine Rolle

Mitochondrien übernehmen vielfältige Aufgaben in den Zellen. Sie versorgen sie unter anderem mittels oxidativer Phosphorylation mit Energie, sind an der Anpassung der Calcium basierten Signalübertragung beteiligt und sind wichtig für das zelluläre Redox-System (Duchen und Szabadkai 2010). Die Anzahl und die Form werden maßgeblich über die Fusion und Teilung bestimmt und an die Bedürfnisse der Zelle angepasst (Westermann 2010). Das innere mitochondriale Membran (IMM) Protein optic atrophy 1 (OPA1) interagiert mit den äußeren mitochondrialen Membran (OMM) Proteinen Mitofusion 1 und Mitofusion 2 (Mfn1 und Mfn2) und formt einen Intramembran-Komplex um die innere und äußere Membran zu fusionieren (Song et al. 2009). Als Gegenspieler der Fusion wird Drp1 zu den Mitochondrien rekrutiert, wo

es oligomerisiert und einen Ring um die OMM bildet was letztendlich in eine Teilung resultiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Drp1 nur für die Teilung OMM verantwortlich ist (Ingerman et al. 2005; Smirnova et al. 2001). Sowohl eine Abweichung in der Regulation der mitochondrialen Teilung als auch der Fusion ist beispielsweise mit schwerwiegenden neurodegenerativen Krankheiten assoziiert (Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000; Zuchner et al. 2004). Die mitochondriale Homöostase scheint demnach ein entscheidender Faktor in verschiedenen Entwicklungsprozessen darzustellen (Bartsakoulia et al. 2018). Die Missregulierung von Drp1 hat einen Effekt auf die Morphologie der Mitochondrien.

Die Expression von Drp1-full-length und Drp1-Deletionskonstrukten mit Hilfe von Mef2-Gal4 hat gezeigt, dass *UAS-drp1-fl-myc* zytoplasmatisch lokalisiert, wohingegen *UAS-drp1-fl-mcherry* in punktuerten Strukturen zu finden ist, dabei scheint es sich teilweise um Mitochondrien zu handeln wie im weiteren Verlauf beschrieben wird. Die Expression von *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry* führt zu einem mit *Mef2-Gal4>>UAS-drp1-fl-mcherry* und *drp1*-Mutanten vergleichbaren leichten Fusionsdefekt. *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* exprimierende Embryonen zeigen überraschenderweise einen stärker ausgeprägten Phänotyp. *UAS-Drp1ΔGTPase-mcherry* zeigt eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. *Drp1 Δ GED-mcherry* liegt dagegen zytoplasmatisch und in punktuerten Strukturen in den Muskeln vor. Die zusätzliche Expression von Drp1 in der Muskulatur hat einen ähnlichen Effekt auf die Fusion wie der Verlust von Drp1. Dabei scheint die Deletion der GED-Domäne von Drp1 einen größeren Effekt auf den Fusionsprozess zu haben als die Deletion der GTPase-Domäne. Die GED-Domäne ist wichtig für die Faltung dieser zur MD-Domäne. Eine Mutation in dieser an Position K679A führt zu einer Reduktion in der GTPase Aktivität und zu einer Oligomerisierung von Drp1, welches sedimentiert werden kann. Eine Überexpression einer K679A-Mutante führt zu einer Reduktion der mitochondrialen Teilung (Zhu et al. 2004). Das könnte darauf hindeuten, dass die fehlende GED-Domäne zu einer drastischeren Verschiebung in der mitochondrialen Homöostase führen könnte. Da die Lokalisation von *Drp1-fl-mcherry* und *Drp1-fl-myc* nicht einheitlich in der Muskulatur zu sein scheint, ergibt sich die Frage, welches eher der wildtypischen Lokalisation entspricht. Um die Lokalisation von Drp1 genauer zu bestimmen, wurden *Drosophila* SL2-Zellen mit *UAS-drp1-fl-mcherry* sowie *UAS-drp1-fl-myc* transfiziert. Die Lokalisation war in beiden Fällen mit der in der Muskulatur vergleichbar. Auch hier lokalisierte *Drp1-fl-mcherry* vermehrt in punktuerte Strukturen, wohingegen *Drp1-fl-myc*

hauptsächlich zytoplasmatisch vorlag. Zusätzlich wurde die Lokalisation von Drp1-fl-eGFP untersucht. Es lokalisiert ebenfalls in punktuieren Strukturen. Drp1  $\Delta$  GTPase-mcherry und Drp1  $\Delta$  GED-mcherry weisen diese ebenfalls auf. Wobei Drp1  $\Delta$  GED-mcherry etwas mehr zytoplasmatisch verteilt zu sein scheint. Führt man einen immunhistochemischen Nachweis mit Hilfe des Drp1-Antikörpers an *UAS-drp1-fl-mcherry* transfizierten SL2-Zellen durch, ist eine Co-Lokalisation zu sehen. Auch in nicht-transfizierten SL2-Zellen lokalisiert Drp1 in punktuieren Strukturen. Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass die Lokalisation von Drp1-fl-mcherry in der Muskulatur und in SL2-Zellen der wildtypischen endogenen Verteilung von Drp1 entspricht. Ein immunhistochemischer Nachweis von CoxIV, einem mitochondrialen Marker, an *UAS-drp1-fl-mcherry* transfizierten SL2-Zellen zeigt eine partielle Co-Lokalisation von Drp1 mit Mitochondrien. Dies bestätigt, dass Drp1 zytoplasmatisch aber auch teilweise mit Mitochondrien assoziiert vorliegt, wie in Verstrecken et al. (2005) beschrieben. Es konnte auch eine partielle Co-Lokalisation zwischen mit dem *cis*-Golgi Marker GM130 und Drp1-fl-mcherry beobachtet werden. Drp1 unterliegt neben einigen Phosphorylierungen einigen posttranslationalen Modifikationen wie Sumoylation, Ubiquitination, S-Nitrosylation und O-linked- $\beta$ -Acetylglukosamierung (Chang und Blackstone 2010; Gawlowski et al. 2012). Es bestätigt daher eine normale Prozessierung von Drp1 in den Zellen. Zudem wurde bestätigt, dass Drp1 auch in der Muskulatur von *Drosophila* vorwiegend zytoplasmatisch vorzuliegend scheint und häufig mit Mitochondrien assoziiert ist. Es stellt sich allerdings die Frage, welche Aufgabe die Mitochondrien während der Fusion einnehmen. In der Immunologischen Synapse (IS), welche ähnlich zu der FuRMAS in *Drosophila* aufgebaut ist, konnte gezeigt werden, dass nach Erkennung einer Antigen-präsentierenden Zelle mit einer Immunzelle eine Rekrutierung von Mitochondrien in Richtung Zell-Zell Kontakt erfolgt (Quintana et al. 2007). Einige Mitochondrien werden nach der Formation der IS entlang von Mikrotubuli in die Nähe der IS rekrutiert (Quintana et al. 2006). Dort angekommen reduzieren die Mitochondrien die lokale  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, wodurch ein anhaltender  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx ausgelöst wird, welcher nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren aktiviert. Der enge Kontakt von Mitochondrien wird über das Aktinzytoskelett ermöglicht. Ein Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts führt zu einer reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx induzierten Signalweiterleitung (Quintana et al. 2007). Ähnliches wurde für die neurologische Synapse beschrieben. Es kommt hier ebenfalls,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig zu einer Relokalisation von Mitochondrien Richtung synaptischen Spalt. Wobei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

abhängig von der Intensität und Frequenz der ankommenden Aktionspotentiale ist (Dubinsky 2009; Nguyen et al. 1997; Vos et al. 2010). Hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen führen zu einer Aktivierung von Calcineurin einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phosphatase (Cereghetti et al. 2008; Guerini 1997). Diese dephosphoryliert und aktiviert somit Drp1, welches nun in der Lage ist mittels mitochondrialer Teilung einen Transport von Mitochondrien an den synaptischen Spalt zu unterstützen (Cereghetti et al. 2008; Verstreken et al. 2005). Calcineurin dephosphoryliert die Position S637, was eine Translokation von Drp1 zu den Mitochondrien auslöst (Campello und Scorrano 2010). Eine Phosphorylierung dieser Stelle durch die Proteinkinase A löst im Gegenteil dazu seine Dissoziation von den Mitochondrien aus (Kashatus et al. 2011; Wang et al. 2012). Eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann von Proteinen mit EF-hand-Domänen wahrgenommen werden. Dazu gehört Swiprosin-1 (Swip1), welches in Vertebraten zusammen mit dem Shark Homologe Syk an der BCR-Signalweiterleitung beteiligt ist (Dutting et al. 2011; Hagen et al. 2012; Krocze et al. 2010; Vega et al. 2008). Interessanterweise geht auch die Myoblastenfusion von C2C12-Zellen mit einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration einher (Horsley und Pavlath 2004). Möglicherweise ist die Myoblastenfusion in *Drosophila* ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und führt, ähnlich wie dies in der neurologische und immunologischen Synapse gezeigt wurde, zu einer Drp1-abhängigen Relokalisation der Mitochondrien zum Zell-Zellkontakt (Dubinsky 2009; Quintana et al. 2007; Vos et al. 2010). Eine einfache Möglichkeit die Aktivität von Drp1 zu regulieren, ist über einen Austausch der Aminosäure an der Position S637. In *Drosophila* besitzt Drp1 zwar kein Serin aber ein Threonin, welches laut einer NetPhosDatenbank-Suche ebenfalls potentiell phosphoryliert werden kann. Ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Asparaginsäure wirkt potentiell als phosphomimetisch. Die Expression von Mef2-Gal4>>UAS-drp1-T637D-mcherry führt zu einem mit Mef2-Gal4>>UAS-drp1  $\Delta$  GED-mcherry vergleichbaren Phänotyp. Das deutet drauf hin, dass die Translokation von Drp1 zu den Mitochondrien auch während der Fusion eine Rolle zu spielen scheint. Eine ähnliche Relokalisation von Mitochondrien während der Zellkommunikation von zwei unterschiedlichen Zelltypen, wie die immunologische oder neuronale Synapse, könnte auch während der Myoblastenfusion stattfinden. Erste Hinweise, dass dies der Fall ist, liefern Lokalisationsstudien in verschiedenen Myoblastenfusionsmutanten, welche auf eine dynamische Lokalisation der Mitochondrien hinweisen. Beurteilt wurde die Lokalisation der Mitochondrien in migrierenden, adhären und in Fusion befindlichen FCMs.

In *duf*, *rst*-Mutanten ist die Adhäsion gestört wohingegen in *sns*<sup>20-15</sup>-Mutanten finden noch vereinzelt Fusionen stattfinden aber die Signalweiterleitung nicht mehr gewährleistet ist. Außerdem wurden auch Mutanten für die Adapterproteine während der Signalweiterleitung Sing und Rols sowie für die Aktinregulation Blow und Kette untersucht. In allen untersuchten Mutanten konnte neben einer zufälligen zytoplasmatischen Verteilung eine Ansammlung von Mitochondrien in der Spitze von migrierenden FCMs beobachtet werden. Ebenfalls vorwiegend einheitlich verhielt sich dies in gerade adhären gewordenen FCM. Dort konnte eine Lokalisation als Foci an der Zell-Zell Kontaktstelle beobachtet werden. Während einer weiter fortgeschrittenen Adhäsion/Fusion der FCM mit der FC/wachsenden Myotube konnte in allen Mutanten eine Auflösung des zuvor vorhandenen Mitochondrien Foci beobachtet werden. In *sing*<sup>22</sup>-Mutanten konnte zusätzlich beobachtet werden, dass hier auch schon in adhären FCM vorwiegend kein Foci mehr beobachtet werden konnte. Dieser erste Einblick in die Lokalisation von Mitochondrien während des Fusionsprozesses, bietet einen kleinen Hinweis darauf, dass dieser ein sehr dynamischer Prozess zu sein scheint. Die Verteilung der Mitochondrien in *sing*<sup>22</sup>-Mutanten könnte darauf hinweisen, dass die Verteilung auch von bereits während der Myoblastenfusion beschriebenen Proteinen abhängig sein könnte. Auf ultrastruktureller Ebene stoppen *sing*<sup>22</sup>-Mutanten nach Etablierung des Präfusionskomplexes wobei vermehrt Präfusionskomplexe zu beobachten sind (Estrada et al. 2007). MARVEL-Domänen Proteine wie Sing sind unter anderem in Vesikel Transport involviert (Sanchez-Pulido et al. 2002). Daher wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Rekrutierung oder in der Exozytose der elektronen-dichten Vesikel an die Membran involviert sein könnte (Estrada et al. 2007). Interessanterweise findet eine Akkumulation von dem Ca<sup>2+</sup>-bindenden EF-hand Domänen Protein DSwip-1 in *sing*<sup>22</sup>-Mutanten statt (Hornbruch-Freitag et al. 2011).

Die bisherige Daten weisen auf eine Beteiligung von Drp1 und Mitochondrien an der embryonalen Myoblastenfusion hin, wobei sich die Frage stellt, ob Drp1 ausschließlich Mitochondrien assoziiert beteiligt ist und welche Rolle die Lokalisation der Mitochondrien während der Fusion spielt. An der IS oder neurologischen Synapse wird Drp1 im Zusammenhang mit einer Drp1-abhängigen Relokalisation von Mitochondrien beschrieben (Quintana et al. 2006; Vos et al. 2010). Außerdem wurde eine Abhängigkeit von mitochondrial zur Verfügung gestelltem ATP und der Freisetzung der RV in der neuronalen Synapse in *Drosophila* beschrieben (Verstreken et al. 2005). Grundsätzlich könnten Mitochondrien, ähnlich wie dies an

der neuronalen Synapse beschrieben wurde, an der Freisetzung der elektronen-dichten Vesikel beteiligt sein indem sie die Energie für die Freisetzung bereitstellen. Es ist auch denkbar, dass sie den hohen Energieverbrauch der F-Aktin Polymerisation decken. Eine detailliertere Einsicht der Regulation und Funktion dieser, könnten ultrastrukturelle Analysen im Wildtyp und Fusionsmutanten geben.

#### **4.5 Die Regulation von Mitochondrien scheint einen Einfluss auf den Fusionsprozess zu haben**

Die Regulation von Drp1 scheint der initiale Schritt in der Relokalisation von Mitochondrien zu sein (Quintana et al. 2006; Vos et al. 2010). Ein System in dem Auswirkungen einer Missregulierung von Drp1 besonders leicht beobachtet werden können ist eine primäre Mausmyoblasten Zellkultur. Hier bietet sich die Möglichkeit die Auswirkungen in der Fusionseffizienz nach Inhibition von Drp1 zu untersuchen. Die Lokalisation von Drp1 und Mitochondrien wurde in undifferenzierten und drei Tage differenzierten primären Mausmyoblasten immunhistochemisch betrachtet. Ähnlich wie *Drosophila*-Embryonen lokalisiert Drp1 zytoplasmatisch in punktuieren Strukturen in undifferenzierten Myoblasten. Mitochondrien sind dagegen eher in größeren punktierten Strukturen zu sehen. Diese Struktur ändert sich vollständig wenn die Zellen für drei Tage differenziert sind und miteinander fusionieren. Hier ist eine deutlich ausgeprägte Netzstruktur zu beobachten. Diese Netzwerk konnte auch in Cos-7 Zellen beobachtet werden (Smirnova et al. 1998; Smirnova et al. 2001). Drp1 schien in den durchgeführten Zellkulturexperimenten an primären Mausmyoblasten außerdem mit Mitochondrien und dem Aktin Zytoskelett assoziiert zu sein. Dies wurde ebenfalls in CV1-Zellen beschrieben und bestätigt die Beobachtungen (De Vos et al. 2005). In dem Zusammenhang ist interessant, dass Aktinfilamente als dynamisches Reservoir für Drp1 zu dienen scheinen (Hatch et al. 2016). Wobei zunächst eine Akkumulation von Aktin erfolgt bevor eine Drp1 abhängige Teilung stattfindet. Eine Inhibition der Aktinpolymerisation verhindert dabei eine Oligomerisierung von Drp1 (Ji et al. 2015). In differenzierten Mausmyoblasten scheint es zu deutlich weniger Teilungen zu kommen als dies unter Poliferationsbedingungen der Fall ist. Die Inkubation von undifferenzierten und unter differenzierenden Bedingungen kultivierten primären Mausmyoblasten mit dem Drp1 spezifischen Inhibitor Mdivi-1, führt zu einer

drastischen Reduktion der Fusionseffizienz. Mdivi-1 unterbindet den Konformationswechsel von Drp1, welcher essentiell für die Faltung des Proteins und die GTPase Aktivität ist (Cassidy-Stone et al. 2008; Ingeman et al. 2005; Warnock et al. 1996). Bereits die Inkubation von 3,75µM Mdivi-1 führt zu einer Fusionsreduktion von 83% im Vergleich zum Wildtyp und der Kontrolle. Dies ist im Einklang mit einer ähnlichen Inhibitionsstudie in primären Mausmyoblasten, bei der die Inhibition von Drp1 über Mdivi-1 ebenfalls zu einer drastischen Reduktion in der Fusionseffizienz führt (Kim et al. 2013). Die Inhibition von Drp1 sollte die mitochondriale Homöostase zwischen Teilung und Fusion empfindlich beeinflussen und daher die drastische Reduktion in den Fusionsevents erklären. Allerdings weisen die Antikörperrnachweise von Drp1 und den Mitochondrien an differenzierten Wildtyp eher darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen Teilung und Fusion zu Gunsten der Fusion verschoben ist. Bis jetzt ist unklar wie die mitochondriale Morphologie in den mit Mdivi-1 behandelten Zellen aussieht. Es gibt Hinweise darauf, dass die mitochondriale Aktivität das Voranschreiten der Differenzierung durch Calcineucin-abhängige Aktivierung von Mef2 und MyoD (Myogener Faktor 3) begünstigen könnte (Friday et al. 2003). MyoD ist als Transkriptionsfaktor während des frühen Differenzierungsprozesses involviert (Rudnicki et al. 1993). Die Daten weisen darauf hin, dass Drp1 an der mitochondrialen Aktivität beteiligt zu sein scheint. Die Inhibition von Drp1 könnte ähnlich wie bereits beschrieben wurde, die Aktivierung von Differenzierungsmarkern beeinträchtigen.

Mitochondrien sind dynamische Organellen und werden aktiv transportiert (Hirokawa et al. 2010; Hollenbeck 1996). Wenn die Relokalisation von Mitochondrien eine Rolle während der Myoblastenfusion spielt würde man erwarten, dass auch die Regulation des Transportes wichtig für die Funktion dieser ist. Zwei Proteine, welche eine Rolle im mitochondrialen Transport spielen sind Milton und Marf. Milton ist ein Kinesin-1 Adapterprotein, welches für mitochondriale Bewegungen in neuronalen *Drosophila* Zellen beschrieben wurde (Glater et al. 2006). Es ist Teil eines Adapterkomplexes, bestehend aus Kinesin-1 (Kinesin heavy chain, KHC), Mitochondrial Rho-GTPase (Miro) und Milton. Dabei verbindet Milton Miro, welches an die OMM bindet, mit Kinesin-1 (Schwarz 2013). Eine Mutation in Milton führt zu einer Abwesenheit von Mitochondrien in den Axonen von Photorezeptoren in *Drosophila* (Gorska-Andrzejak et al. 2003; Stowers et al. 2002). Alle Homologe von Milton teilen sich die Fähigkeit mit Mitochondrien zu interagieren, deren Verteilung zu beeinflussen und an Kinesin-1 zu binden

(Brickley et al. 2005; Glater et al. 2006; Smith et al. 2006; Stowers et al. 2002). In *milt*-Mutanten erscheinen die Muskeln dünner als im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem fehlen vereinzelt Muskeln. Marf (*Drosophila* Mitofusin) ist an der mitochondrialen Fusion und Transport dieser beteiligt. Der Verlust von Marf führt ähnlich wie dies für Milton beschrieben wurde, zu einer Abwesenheit von Mitochondrien in Axonen (Sandoval et al. 2014). In Säugetieren regulieren Mitofusion 1 (Mfn1) und Mitofusion 2 (Mfn2) die Fusion der OMM, wohingegen Opa1 für die Fusion der IMM benötigt wird (Chan 2012; Mishra et al. 2014). Für Mfn2 wurde eine direkte Interaktion mit Miro beschrieben (Misko et al. 2010). *marf*-Mutanten weisen einen starken Fusionsdefekt während der Myogenese auf. Die Phänotypen von Milton und Marf weisen beide auf eine Beteiligung beider Proteine an der Myoblastenfusion hin. Basierend auf die für die Proteine beschriebenen Funktionen, ist das ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Mitochondrien am Fusionsprozess. Die genaue Funktion muss allerdings weiter untersucht werden. Wenn die Homöostase der Mitochondrien wichtig für die Fusion ist sollten Dosisexperimente mit Marf und Blow sowie Opa und Blow weiter Aufschluss darüber geben. Entstehen dabei Fusionsdefekte, ist es ein Indiz, dass die Homöostase der Mitochondrien entscheidend ist. Die Regulation der Mitochondrien ist durchaus sehr komplex. Die Proteine der Rab-Familie wurden ebenfalls für die Regulation dieser beschrieben. Rab4 fördert den lysosomalen Abbau von Drp1 in humanen T-Zellen (Caza et al. 2014). Dabei führt die Überexpression von Rab4 zu einer Erhöhung der mitochondrialen Masse (Caza et al. 2014). Die Expression eines potentiell konstitutiv-aktiv wirkendem Rab4 (*Mef2-Gal4>>UAS-rab4-Q67L-YFP*) führt zu unfusioniert vorliegenden FCMs, dünner wirkenden Muskeln und vermutlich Anheftungsdefekten der Muskeln. Ein weiteres Protein aus der Rab Familie Rab11 scheint ebenfalls eine Rolle in der Regulation von Drp1 eine Rolle zu spielen. Es ist an der Lokalisation von Drp1 zu den Mitochondrien beteiligt und hilft bei der Verteilung dieser zu Aktin-reichen Strukturen zu ermöglichen (Landry et al. 2014). Ähnlich wie dies für die Expression von Rab4 gezeigt werden konnte führt auch die Expression von einem potentiell konstitutiv-aktiv wirkenden *Mef2-Gal4>>UAS-rab11-Q70L-YFP* zu einem Defekt in der Formation der Muskulatur. Die Ausbildung der lateralen Muskulatur ist beeinträchtigt und es kommt vereinzelt zu unfusionierten FCMs. Insgesamt gibt es einige Hinweise darauf, dass die Regulierung von Drp1 und die damit verbundene Regulation der Mitochondrien einen Einfluss auf die Bildung der embryonalen Muskulatur haben.



#### 4.6 Das Mitglied der Dynamin-Superfamilie Shibire spielt eine Rolle bei der Myogenese

Das *Drosophila* Protein Shibire ist wie Drp1 Mitglied der Dynamin-Superfamilie. Eine besonders wichtige Rolle nehmen Dynamine bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose und beim Recycling von Vesikeln an der Synapse ein (Antonny et al. 2016; Ferguson und De Camilli 2012). Shibire ist dabei das *Drosophila* Ortholog des klassischen Dynamins aus Vertebraten (Chen et al. 1991; van der Bliek und Meyerowitz 1991). Eine Temperatur-sensitive *shibire*-Mutante zeigt einen reversiblen paralytischen Phänotyp aufgrund einer Blockade des synaptischen Vesikel Recyclings (Kosaka und Ikeda 1983; Poodry und Edgar 1979). Wird die Funktion von Shibire blockiert führt dies zu einer Blockade in der Endozytose (Moline et al. 1999). Shibire wurde bereits während der frühen Myogenese untersucht. Die Expression eines dominant-negativ wirkenden Shibire (K44) führte zu einem Fusionsdefekt basierend auf einer fehlerhaften Determination der Myoblasten (Dottermusch-Heidel et al. 2012). Exprimiert man *UAS shibireK44* anstatt ab Stadium 7 erst ab Stadium 11 mit *Mef2-Gal4*, ist ein verminderter Fusionsdefekt erkennbar. Es sind lediglich vereinzelt unfusionierte FCM zu beobachten.

Um zu analysieren, ob die Dynamin-anhängige Endozytose wichtig für die Myoblastenfusion ist, wurden die GTPase und die Prolin-reiche Region von Shibire deletiert und in *Drosophila* Embryonen exprimiert. In Cos-7 Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die GTPase Hydrolyse essentiell für seine Endozytose-Aktivität zu sein scheint (Marks et al. 2001). In *Drosophila* führt eine Deletion der GTPase-Domäne zusammen mit der Prolin-reichen Region von Shibire, welche an viele SH3-Domänen Proteine binden kann, zu einem leichten Fusionsdefekt mit fehlenden Muskeln (Konstrukt hergestellt von C. Braukmann). Eine Kernzählung steht dazu noch aus. Dabei lokalisiert *Mef2-Gal4>>UAS shibire-Δ GED Δ PRR-mcherry* nicht nur zytoplasmatisch, sondern scheinbar auch an der Membran der Myoblasten. Die Embryonen weisen einen stärkeren Phänotyp auf als *Mef2-Gal4>>UAS shibireK44* sowie *Mef2-Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* getriebene Embryonen. Das Dynamin-Protein Shibire scheint an der Myogenese beteiligt zu sein. Es ist jedoch nicht klar, ob der Phänotyp alleine durch die Deletion der GTPase-Domäne oder durch die PRR-Region von Shibire verursacht wird oder ein Zusammenspiel von beiden wichtig ist. Wenn die GTPase Funktion essentiell für die Abschnürung von Vesikel von der Membran und dieser Prozess wichtig für die Myoblastenfusion ist, sollte die Deletion dieser Domäne ausreichend für eine Störung in der Fusion sein. Ähnlich wie dies in Zellkultur bereits gezeigt

werden konnte (Marks et al. 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Dynamin nicht nur an der Endozytose beteiligt ist, sondern auch noch bei der Regulation der F-Aktin Polymerisation von Podosomen involviert ist (Bruzzaniti et al. 2005; Bruzzaniti et al. 2009; Ochoa et al. 2000). Interessanterweise führt eine Deletion von Dynamin 1 und 2 in Osteoklasten und primären Mausmyoblasten zu einer starken Reduktion in der Fusionseffizienz dieser (Shin et al. 2014). Dies weist darauf hin, dass Dynamin direkt oder indirekt ein wichtiger Faktor für die homophilische Fusion von Osteoklasten und primären Myoblasten zu sein scheint. Es gibt Hinweise darauf, dass nicht nur bei der Endozytose Clathrin-abhängige Vesikel gebildet werden, sondern diese auch am *trans*-Golgi gebildet werden (Robinson und Pimpl 2014). Für Dynamin ist bereits bekannt, dass es bei der Abschnürung von Clathrin-abhängigen Vesikel involviert ist (Ferguson und De Camilli 2012; Schmid und Frolov 2011; van der Bliek und Payne 2010). Unklar ist, ob Clathrin-abhängige Vesikel am *trans*-Golgi auch in *Drosophila* vorkommen. Interessant wäre dies im Zusammenhang mit den bislang nicht näher definierten elektronen-dichten Vesikeln. Ob Shibire nun allgemein bei der Endozytose während der Fusion eine Rolle spielt oder ob im speziellen an der Freisetzung der elektronen-dichten Vesikel am *trans*-Golgi beteiligt sein könnte gilt zu klären. Des Weiteren gilt zu klären, ob Shibire allein oder in Redundanz agiert.

#### 4.7 Die Expression von Shark und Drp1 in der IFM führt zu Defekten der DLM

Die Entwicklung der Embryogenese kann teilweise durch bereits maternal bereitgestellte mRNA bis in spätere Entwicklungsstadien gesichert werden. Dies wurde beispielsweise sehr deutlich für den F-Aktin Regulator Wasp gezeigt. Hier konnte maternal bereitgestelltes Wasp bis in Stadium 14 detektiert werden. Zudem reicht die maternale Komponente aus um einen zygotischen Verlust von Wasp zu retten (Schafer et al. 2007). *in situ*-Analysen der *drp1* und *shark* mRNA Verteilung zeigen, dass beide Proteine eine starke maternale Komponente aufweisen (Dissertation Freitag 2013). Bei der adulten Myogenese liegt keine maternale Komponente mehr vor. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die adulte Flugmuskulatur als Model zur Analyse der potentiellen Interaktionspartner von Blow genutzt. Hierzu wurden verschiedene UAS-Konstrukte von *shark* und *drp1* sowie entsprechende RNAi mittels zwei verschiedener Treiberlinien während der

adulten Myogenese, spezifisch in der indirekte Flugmuskulatur (IDF), exprimiert. Die Treiberlinie 1151-Gal4 wird in allen adulten Muskelvorläuferzellen (AMPs) während der Myoblastenfusion exprimiert. Actin88-Gal4 ist dagegen spezifisch für die IFMs und wird etwa in 18 Stunden nach APF, ab dem Zeitpunkt der Anheftung der Muskeln und nach der Myoblastenfusion, exprimiert (Weitkunat und Schnorrer 2014). Zusätzlich wurde Mef2-Gal4 genutzt, was schon ab Stadium 11 der Embryogenese aktiv ist, aber auch während der adulten Myogenese exprimiert wird. Die Analyse der DLMs von *1151Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* und *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimierenden Fliegen wies keinen Unterschied im allgemeinen Aufbau der Myofibrillen im Vergleich zum Wildtyp auf (Rai et al. 2014). Allerdings weisen die Muskeln in *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimierenden Tieren innerhalb der einzelnen Muskeln eine Dissoziation einzelner Myofibrillenpakete auf. Ebenso schien allgemein die Flugfähigkeit dieser Tiere beeinträchtigt zu sein, da sie eine deutliche Reduktion in ihrer Flugfähigkeit von 49% aufwiesen. Die Integrität der DLMs wurde über Paraffinschnitte beurteilt (Kooperation Arbeitsgruppe Dr. Halyana Shcherbata, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen). In den longitudinalen und transversalen Paraffinschnitten zeigt sich, dass die Myofibrillen scheinbar weniger Zusammenhalt aufwiesen als in den Kontrollen. Die Reduktion der *shark* mRNA mittels RNAi hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Integrität der Muskeln. Die Flugfähigkeit der *Actin88Gal4>>UAS-shark Δ kin-mcherry* exprimierenden Tieren zeigt allerdings auch hier eine deutliche Reduktion von 50%. Die Expression von Shark, dem die Kinase-Domäne fehlt scheint demnach einen Effekt auf die Funktionalität der DMLs zu haben, wenn die Expression ab dem Zeitpunkt der Anheftung der Muskeln erfolgt.

Die Expression von Drp1 in den IFMs wurde ebenfalls untersucht. Die adulte Muskelentwicklung scheint in *UAS-drp1-fl-mcherry* exprimierenden Tieren nicht beeinträchtigt zu sein. Dagegen weisen *Actin88Gal4>>UAS-drp Δ GTPase-mcherry* Fliegen keine normale Aktin-Filamentstruktur mehr auf. In *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* exprimierenden Tieren ist im Gegenteil dazu zwar eine geordnete Struktur zu beobachten, welche allerdings immer wieder von Aktin Ansammlungen unterbrochen wird. Der bei *Actin88Gal4>>UAS-drp Δ GTPase-mcherry* Tieren beobachtete Phänotyp weist eher auf einen Degradierungsprozess hin, wohingegen die Aktin Ansammlungen in *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* Tieren möglicherweise auf Defekte in den Aktin-

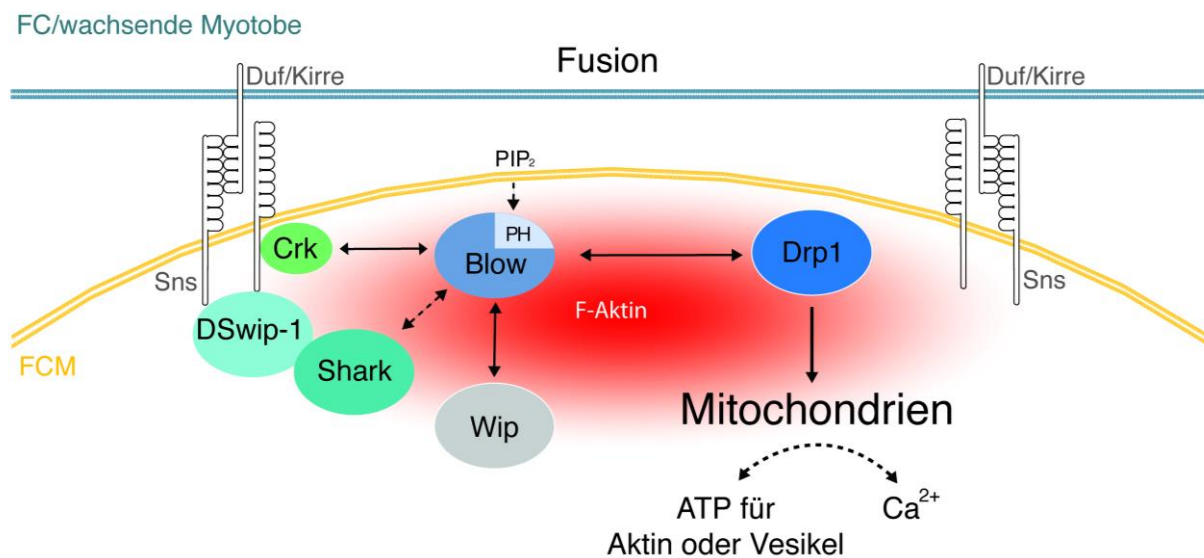
Myosinfilamenten oder Anheftung der Muskelzelle an die Tendonzelle hinweisen. Die Expression des potentiell dominant-negativen *Actin88Gal4>>UAS-drp1 T637D-mcherry* scheint den Zusammenhalt der Myofibrillen zu beeinträchtigen. Die Expression von allen Konstrukten, besonders mit *Actin88Gal4* führt zu einer Beeinträchtigung in der Flugfähigkeit. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Regulierung der Mitochondrien während der DLM Entwicklung eine Rolle zu spielen scheint. Paraffindünnschnitte der Embryonen zeigt ein ähnliches Bild. Die Muskeln in *Actin88Gal4>>UAS-drp1 fl mcherry* Tieren führt zu kleineren Myofibrillenbündel als dies im Wildtyp der Fall ist. *Actin88Gal4>>UAS-drp1Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-myc* exprimierende Tiere weisen eine drastischen Reduktion in der Muskelgröße mit gleichbleibender Anzahl auf. Die Expression von *Actin88Gal4>>UAS-drp1-fl-myc* führt zu etwas verkleinerten Myofibrillenbündeln. Wird die Menge an Drp1 reduziert sind die Muskelbündel etwas dünner ausgeprägt als im Wildtyp. Die Expression von Drp1 Konstrukten mit *actin88-Gal4* führt allerdings in allen Fällen zu einer Reduktion der durchschnittlichen Flugfähigkeit um etwa 50%. Wird die Drp1 RNAi dagegen mittels *actin88-Gal4* exprimiert, führt dies zu einer nicht ganz so starken Reduktion von lediglich 25%. Die Daten weisen darauf hin, dass die Regulation der GTPase- und GED-Domäne von Drp1 eine Bedeutung für die Entwicklung der DLM hat, da die Expression von Deletionskonstrukten einen drastischen Effekt auf diese zu haben scheint. Die Runterregulierung von Drp1 mittels RNAi dagegen, führt zu keinem stark ausgeprägten Defekt. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Drp1 zu einer stärkeren Vernetzung der Mitochondrien in L3-Larven führt. Die Reduzierung von Drp1 mit Hilfe von RNAi führt allerdings scheinbar zu keiner Beeinträchtigung in der Funktionalität der Mitochondrien (Wang et al. 2016). Möglicherweise führt die Expression der Deletionskonstrukte zu einer verminderten Funktionalität der Mitochondrien und damit zur Mitophagie. Dies könnte die Bereitstellung von ATP für die Etablierung der Aktinfilamente stark reduzieren, was die bei *Actin88Gal4>>UAS-drp1Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* exprimierenden Tieren induzierten Phänotypen erklären könnte. Es ist des Weiteren noch ungeklärt, ob die Degeneration der Muskeln dabei eine Rolle spielt, bei der eine zeitliche Komponente ebenfalls wichtig sein könnte. Dafür könnte die Präparation der Fliegen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung der DLM sowie die Expression von mito-GFP hilfreich sein. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ), um eine Auskunft

über die Integrität der Mitochondrien zu erhalten kann zusätzlich interessant sein. Es gibt Hinweise darauf, dass der Verlust oder eine alterierte Expression von Drp1 zu degenerativen Erkrankungen führt. Die Förderung der mitochondrialen Teilung kann beispielsweise degenerative Phänotypen in *pink1*- und *parkin*-Mutanten retten (Deng et al. 2008; Poole et al. 2008; Yang et al. 2008). Dies könnte die mit *Actin88Gal4>>UAS-drp1Δ GTPase-myc* und *Actin88Gal4>>UAS-drp1 Δ GED-mcherry* beobachteten Phänotypen erklären. Eine ultrastrukturelle Untersuchung kann dazu weitere Hinweise geben. Blow und Shark dagegen sind bis jetzt noch nicht für die IFM beschrieben worden. Eine Frage die sich für alle Expressionsexperimente der IFM stellt ist, ob die Proteine zum einen endogen vorkommen und zum anderen, ob sie die gleiche Funktion einnehmen wie dies bereits für die Embryogenese beschrieben wurde. Aus der Muskelentwicklung während der Embryogenese ist bekannt, dass die Funktion der Proteine unterschiedlich in verschiedenen Muskelgruppen ist. So ist beispielsweise bekannt, dass die Funktion für die somatische Muskulatur eine andere ist als die während der visceralen Entwicklung (Rudolf et al. 2014). Das muss in der IFM noch untersucht werden. Ein Aspekt der sehr auffallend ist, ist dass die beobachteten Defekte ausschließlich mit der Expression von *Actin88Gal4* zu beobachten waren, nicht jedoch mit *Mef2-Gal4* oder *1151Gal4*. Da wäre es interessant zu überprüfen, ob die Expressionsintensität bei den Treiberlinien vergleichbar ist. Für die Expression von *UAS-mCD8-GFP* mit den Treiberlinien *actin88Gal4* und *1151Gal4* konnte ab 24 Stunden APF *in vivo* ein GFP Signal in den drei Muskeltemplates beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zur Weiteren Charakterisierung, besonders bei den Experimenten, bei denen die Muskeln im Vergleich zum Wildtyp kleiner waren, würde eine Kernzählung Aufschluss über einen Fusionsdefekt geben.

#### 4.8 Zusammenfassendes Model

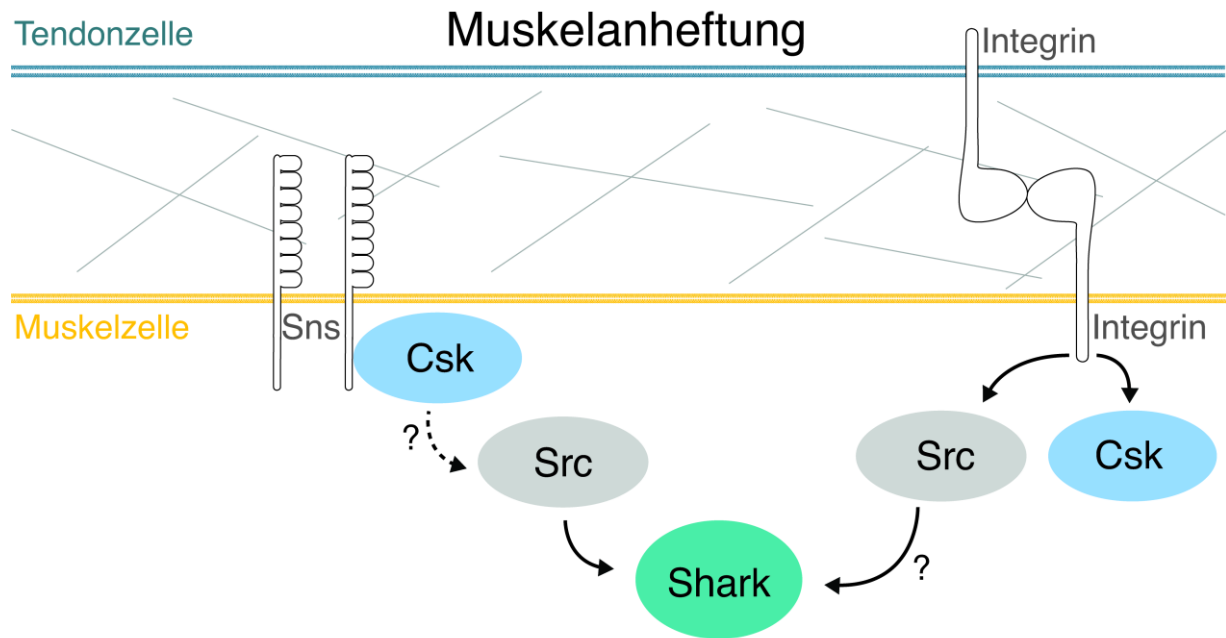
Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erlauben es ein Model zur Funktion der potentiellen Interaktionspartner von Blow, Shark und Drp1 während der Myoblastenfusion aufzustellen. Nach erfolgreicher Erkennung und Anheftung wird Blow entweder über ein Adapterprotein wie Crk an den Zell-Zell Kontakt rekrutiert (Abb. 54). Dabei ist die Funktion der PH-Domäne von Blow noch unklar, sie könnte jedoch zur Rekrutierung oder als lokaler Anker an der Zell-Adhäsionsstellen dienen. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass die Tyrosinkinase Shark möglicherweise an der Phosphorylierung von Sns und Signalweiterleitung nach erfolgreicher

Adhäsion beteiligt sein könnte. Allerdings gilt es die genetische Interaktion zwischen Blow und Shark weiter zu untersuchen. Da die vermutlich Drp1-abhängige Lokalisation der Mitochondrien dynamisch am Zell-Zell Kontakt von FC/wachsender Myotube und FCM zu sein scheint, legt es die Vermutung nahe, dass diese die hohe Nachfrage an ATP decken, welche durch die F-Aktin Polymerisation auf Seiten der FCM entstehen. Vorstellbar ist auch eine Beteiligung von Drp1 an der Freisetzung der elektronendichten Vesikel. Außerdem bieten sie ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Reservoir, welches die Calcium-abhängige Signalweiterleitung mit Hilfe von Calcium-bindenden Proteinen, wie DSwip-1, unterstützen würde.



**Abb. 54: Model zur möglichen Rolle von Drp1 und Shark während der embryonalen Myoblastenfusion.** Shark scheint zum einen am Zell-Zell Kontakt an der Signalweiterleitung beteiligt zu sein und zum anderen eine Rolle bei der Anheftung der Muskeln Integrin-abhängig beteiligt zu sein. Genetische Interaktionsdaten weisen darauf hin, dass sowohl Blow und Shark als auch Blow und Drp1 genetisch miteinander interagieren. Drp1 ist dabei möglicherweise an der dynamischen Lokalisation der Mitochondrien am Zellkontakt verantwortlich. Durchgezogene Pfeile deuten eine bereits bestätigte Funktion an; gestrichelte Pfeile eine mögliche Funktion.

Des Weiteren legen Ergebnisse von Shark-Deletionskonstrukt exprimierenden Embryonen nahe, dass Shark über Src eine Funktion im Integrin-Signalweg haben könnte, wo es die Anheftung der Muskeln an ihre epidermale Anheftungsstelle beeinflusst. Weiterführende Untersuchungen sind dabei jedoch nötig, um die Funktion von Drp1 während der Fusion und die Rolle von Shark am Zell-Zell Kontakt sowie während der Anheftung der Muskeln zu verstehen.



**Abb. 55: Model zur möglichen Rolle von Shark während der embryonalen Muskelanheftung.** Csk dissoziiert von Integrin. Src wird aktiviert und könnte für die Phosphorylierung von Shark verantwortlich sein. Csk könnte mit Sns interagieren und möglicherweise Shark aktivieren. Durchgezogene Pfeile deuten eine bereits bestätigte Funktion an; gestrichelte Pfeile eine mögliche Funktion.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abmayr SM und Pavlath GK. (2012)** Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139:641-656.
- Akbari OS, Oliver D, Eyer K und Pai CY. (2009)** An Entry/Gateway cloning system for general expression of genes with molecular tags in *Drosophila melanogaster*. *BMC cell biology* 10:8.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS und Wissinger B. (2000)** OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics* 26:211-215.
- Antonny B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, Faelber K, Ford M, Frolov VA, Frost A, Hinshaw JE, Kirchhausen T, Kozlov MM, Lenz M, Low HH, McMahon H, Merrifield C, Pollard TD, Robinson PJ, Roux A und Schmid S. (2016)** Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* 35:2270-2284.
- Artero RD, Castanon I und Baylies MK. (2001)** The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128:4251-4264.
- Ashrafian H, Docherty L, Leo V, Towlson C, Neilan M, Steeples V, Lygate CA, Hough T, Townsend S, Williams D, Wells S, Norris D, Glyn-Jones S, Land J, Barbaric I, Lalanne Z, Denny P, Szumska D, Bhattacharya S, Griffin JL, Hargreaves I, Fernandez-Fuentes N, Cheeseman M, Watkins H und Dear TN. (2010)** A mutation in the mitochondrial fission gene *Dnm1l* leads to cardiomyopathy. *PLoS genetics* 6:e1001000.
- Atwood HL und Wojtowicz JM. (1986)** Short-term and long-term plasticity and physiological differentiation of crustacean motor synapses. *International review of neurobiology* 28:275-362.
- Babich A, Li S, O'Connor RS, Milone MC, Freedman BD und Burkhardt JK. (2012)** F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLCgamma1 signaling during T cell activation. *J Cell Biol* 197:775-787.
- Baixaui F, Martin-Cofreces NB, Morlino G, Carrasco YR, Calabria-Linares C, Veiga E, Serrador JM und Sanchez-Madrid F. (2011)** The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO J* 30:1238-1250.
- Balla T. (2005)** Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* 118:2093-2104.
- Bartsakoulia M, Pyle A, Troncoso-Chandia D, Vial-Brizzi J, Paz-Fiblas MV, Duff J, Griffin H, Boczonadi V, Lochmuller H, Kleinle S, Chinnery PF, Grunert S, Kirschner J, Eisner V und Horvath R. (2018)** A novel mechanism causing imbalance of mitochondrial fusion and fission in human myopathies. *Human molecular genetics* 27:1186-1195.
- Bate M. (1990)** The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110:791-804.
- Batista FD, Iber D und Neuberger MS. (2001)** B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411:489-494.



- Baylies MK und Bate M. (1996)** twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272:1481-1484.
- Beckett K und Baylies MK. (2007)** 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev Biol* 309:113-125.
- Ben-Yaacov S, Le Borgne R, Abramson I, Schweisguth F und Schejter ED. (2001)** Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. *J Cell Biol* 152:1-13.
- Berger S, Schafer G, Kesper DA, Holz A, Eriksson T, Palmer RH, Beck L, Klamt C, Renkawitz-Pohl R und Onel SF. (2008)** WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* 121:1303-1313.
- Bhar D, Karren MA, Babst M und Shaw JM. (2006)** Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *The Journal of biological chemistry* 281:17312-17320.
- Birnboim HC und Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F und Basler K. (2007)** An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3312-3317.
- Blochlinger K, Jan LY und Jan YN. (1991)** Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in *Drosophila*. *Genes & development* 5:1124-1135.
- Bonn BR, Rudolf A, Hornbruch-Freitag C, Daum G, Kuckwa J, Kastl L, Buttgerit D und Renkawitz-Pohl R. (2013)** Myosin heavy chain-like localizes at cell contact sites during *Drosophila* myoblast fusion and interacts in vitro with Rolling pebbles 7. *Experimental cell research* 319:402-416.
- Bour BA, Chakravarti M, West JM und Abmayr SM. (2000)** *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes & development* 14:1498-1511.
- Brickley K, Smith MJ, Beck M und Stephenson FA. (2005)** GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *The Journal of biological chemistry* 280:14723-14732.
- Brodin L, Bakeeva L und Shupliakov O. (1999)** Presynaptic mitochondria and the temporal pattern of neurotransmitter release. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354:365-372.
- Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D und Schlattner U. (2009)** Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences* 10:2763-2788.
- Bruzzaniti A, Neff L, Sanjay A, Horne WC, De Camilli P und Baron R. (2005)** Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Molecular biology of the cell* 16:3301-3313.
- Bruzzaniti A, Neff L, Sandoval A, Du L, Horne WC und Baron R. (2009)** Dynamin reduces Pyk2 Y402 phosphorylation and SRC binding in osteoclasts. *Molecular and cellular biology* 29:3644-3656.
- Bulchand S, Menon SD, George SE und Chia W. (2010)** The intracellular domain of Dumbfounded affects myoblast fusion efficiency and interacts with Rolling pebbles and Loner. *PLoS One* 5:e9374.

- Campello S und Scorrano L. (2010)** Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep* 11:678-684.
- Campellone KG und Welch MD. (2010)** A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:237-251.
- Carmena A, Bate M und Jimenez F. (1995)** Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes & development* 9:2373-2383.
- Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingberman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR und Nunnari J. (2008)** Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental cell* 14:193-204.
- Caza TN, Fernandez DR, Talaber G, Oaks Z, Haas M, Madaio MP, Lai ZW, Miklossy G, Singh RR, Chudakov DM, Malorni W, Middleton F, Banki K und Perl A. (2014)** HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. *Annals of the rheumatic diseases* 73:1888-1897.
- Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P und Scorrano L. (2008)** Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15803-15808.
- Chan DC. (2012)** Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics* 46:265-287.
- Chang CR und Blackstone C. (2010)** Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201:34-39.
- Chang CR, Manlandro CM, Arnoult D, Stadler J, Posey AE, Hill RB und Blackstone C. (2010)** A lethal de novo mutation in the middle domain of the dynamin-related GTPase Drp1 impairs higher order assembly and mitochondrial division. *The Journal of biological chemistry* 285:32494-32503.
- Chen EH und Olson EN. (2001)** Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Developmental cell* 1:705-715.
- Chen EH, Pryce BA, Tzeng JA, Gonzalez GA und Olson EN. (2003)** Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell* 114:751-762.
- Chen EH und Olson EN. (2004)** Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends in cell biology* 14:452-460.
- Chen H und Chan DC. (2009)** Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Human molecular genetics* 18:R169-176.
- Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SC und Vallee RB. (1991)** Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* 351:583-586.
- Cho B, Choi SY, Cho HM, Kim HJ und Sun W. (2013)** Physiological and pathological significance of dynamin-related protein 1 (drp1)-dependent mitochondrial fission in the nervous system. *Experimental neurobiology* 22:149-157.
- Cohen LA, Honda A, Varnai P, Brown FD, Balla T und Donaldson JG. (2007)** Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Molecular biology of the cell* 18:2244-2253.

- da Silva AF, Mariotti FR, Maximo V und Campello S. (2014)** Mitochondria dynamism: of shape, transport and cell migration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71:2313-2324.
- De Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ und Sheetz MP. (2005)** Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 15:678-683.
- DeFranco AL. (1997)** The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Current opinion in immunology* 9:296-308.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J und Hamel CP. (2000)** Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics* 26:207-210.
- Deng H, Dodson MW, Huang H und Guo M. (2008)** The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14503-14508.
- Denker A und Rizzoli SO. (2010)** Synaptic vesicle pools: an update. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2:135.
- Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, Tybulewicz VL und Batista FD. (2008)** CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nature immunology* 9:63-72.
- Derivery E und Gautreau A. (2010)** Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* 32:119-131.
- DiMauro S und Schon EA. (2008)** Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annual review of neuroscience* 31:91-123.
- DiNitto JP und Lambright DG. (2006)** Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochimica et biophysica acta* 1761:850-867.
- Doberstein SK, Fetter RD, Mehta AY und Goodman CS. (1997)** Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* 136:1249-1261.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC und Healy JI. (1997)** Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858.
- Dottermusch-Heidel C, Groth V, Beck L und Onel SF. (2012)** The Arf-GEF Schizo/Loner regulates N-cadherin to induce fusion competence of Drosophila myoblasts. *Developmental biology* 368:18-27.
- Duan H, Skeath JB und Nguyen HT. (2001)** Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128:4489-4500.
- Dubinsky JM. (2009)** Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location! *Experimental neurology* 218:293-307.
- Duchen MR und Szabadkai G. (2010)** Roles of mitochondria in human disease. *Essays in biochemistry* 47:115-137.
- Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, Widder P, Rosenberger F, van der Merwe PA, Allen PM und Shaw AS. (1998)** A novel adaptor protein

- orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94:667-677.
- Dutting S, Brachs S und Mielenz D. (2011)** Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions. *Cell communication and signaling : CCS* 9:2.
- Dworak HA, Charles MA, Pellerano LB und Sink H. (2001)** Characterization of *Drosophila* hibris, a gene related to human nephrin. *Development* 128:4265-4276.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M und Kirschner MW. (2002)** Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418:790-793.
- Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B und Wienands J. (2007)** Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunological reviews* 218:235-246.
- Erickson MR, Galletta BJ und Abmayr SM. (1997)** *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 138:589-603.
- Estrada B, Choe SE, Gisselbrecht SS, Michaud S, Raj L, Busser BW, Halfon MS, Church GM und Michelson AM. (2006)** An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS genetics* 2:e16.
- Estrada B, Maeland AD, Gisselbrecht SS, Bloor JW, Brown NH und Michelson AM. (2007)** The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Developmental biology* 307:328-339.
- Feller SM. (2001)** Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20:6348-6371.
- Ferguson SM und De Camilli P. (2012)** Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:75-88.
- Fernandes J, Bate M und Vijayraghavan K. (1991)** Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* 113:67-77.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M und Rao A. (2006)** A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179-185.
- Fields S und Song O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Fischbach KF, Linneweber GA, Andlauer TF, Hertenstein A, Bonengel B und Chaudhary K. (2009)** The irre cell recognition module (IRM) proteins. *Journal of neurogenetics* 23:48-67.
- Freitag C. (2013)** Characterization of new components involved in *Drosophila* myogenesis in the embryo and in the male reproductive system. *Entwicklungsbiologie- Philipps-Universität Marburg*.
- Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM und Pavlath GK. (2003)** Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation; research in biological diversity* 71:217-227.
- Fritzen K. (2013)** The localization of the Shark kinase to FCM-specific foci during embryonic myogenesis appears to be dependent on 'DSwiprosin-1' and the adhesion molecule 'Sticks and Stones'.
- Fu C, Turck CW, Kurosaki T und Chan AC. (1998)** BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9:93-103.

- Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel CL, Harrison ML und Geahlen RL. (1997)** Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochimica et biophysica acta* 1355:177-190.
- Galletta BJ, Niu XP, Erickson MR und Abmayr SM. (1999)** Identification of a Drosophila homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene* 228:243-252.
- Galletta BJ, Chakravarti M, Banerjee R und Abmayr SM. (2004)** SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mechanisms of development* 121:1455-1468.
- Gawłowski T, Suarez J, Scott B, Torres-Gonzalez M, Wang H, Schwappacher R, Han X, Yates JR, 3rd, Hoshijima M und Dillmann W. (2012)** Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked-beta-N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 287:30024-30034.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA und Schiestl RH. (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20:1425.
- Gildor B, Massarwa R, Shilo BZ und Schejter ED. (2009)** The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate Drosophila myoblast fusion. *EMBO Rep* 10:1043-1050.
- Gildor B, Schejter ED und Shilo BZ. (2012)** Bidirectional Notch activation represses fusion competence in swarming adult Drosophila myoblasts. *Development* 139:4040-4050.
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrolla S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL, Jr., White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J und Rothberg JM. (2003)** A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science* 302:1727-1736.
- Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS und Schwarz TL. (2006)** Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173:545-557.
- Goitsuka R, Fujimura Y, Mamada H, Umeda A, Morimura T, Uetsuka K, Doi K, Tsuji S und Kitamura D. (1998)** BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* 161:5804-5808.
- Gorska-Andrzejak J, Stowers RS, Borycz J, Kostyleva R, Schwarz TL und Meinertzhagen IA. (2003)** Mitochondria are redistributed in Drosophila photoreceptors lacking milton, a kinesin-associated protein. *The Journal of comparative neurology* 463:372-388.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM und Dustin ML. (1999)** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.
- Griffiths GM, Tsun A und Stinchcombe JC. (2010)** The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol* 189:399-406.
- Guerini D. (1997)** Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochemical and biophysical research communications* 235:271-275.
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H und Brent R. (1993)** Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.

- Hagen S, Brachs S, Kroczeck C, Furnrohr BG, Lang C und Mielenz D. (2012)** The B cell receptor-induced calcium flux involves a calcium mediated positive feedback loop. *Cell calcium* 51:411-417.
- Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, Harms M, Nardine T, Luo L und Dickson BJ. (2002)** Rac function and regulation during Drosophila development. *Nature* 416:438-442.
- Hamp J, Lower A, Dottermusch-Heidel C, Beck L, Moussian B, Flotenmeyer M und Onel SF. (2016)** Drosophila Kette coordinates myoblast junction dissolution and the ratio of Scar-to-WASp during myoblast fusion. *J Cell Sci* 129:3426-3436.
- Haralalka S, Shelton C, Cartwright HN, Katzfey E, Janzen E und Abmayr SM. (2011)** Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in Drosophila. *Development* 138:1551-1562.
- Harden N. (2002)** Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in Drosophila. *Differentiation; research in biological diversity* 70:181-203.
- Hatch AL, Ji WK, Merrill RA, Strack S und Higgs HN. (2016)** Actin filaments as dynamic reservoirs for Drp1 recruitment. *Molecular biology of the cell* 27:3109-3121.
- Heisenberg CP. (2009)** Dorsal closure in Drosophila: cells cannot get out of the tight spot. *BioEssays* 31:1284-1287.
- Helming L und Gordon S. (2009)** Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in cell biology* 19:514-522.
- Hiltbold EM, Poloso NJ und Roche PA. (2003)** MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* 170:1329-1338.
- Hirokawa N, Niwa S und Tanaka Y. (2010)** Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610-638.
- Hollenbeck PJ. (1996)** The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1:d91-102.
- Hornbruch-Freitag C, Griemert B, Buttgereit D und Renkawitz-Pohl R. (2011)** Drosophila Swiprosin-1/EFHD2 accumulates at the prefusion complex stage during Drosophila myoblast fusion. *J Cell Sci* 124:3266-3278.
- Horsley V und Pavlath GK. (2004)** Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells, tissues, organs* 176:67-78.
- Hu C, Huang Y und Li L. (2017)** Drp1-Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *International journal of molecular sciences* 18.
- Hwang KJ, Mahmoodian F, Ferretti JA, Korn ED und Gruschus JM. (2007)** Intramolecular interaction in the tail of Acanthamoeba myosin IC between the SH3 domain and a putative pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:784-789.
- Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M und Sadoshima J. (2015)** Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circulation research* 116:264-278.
- Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE und Nunnari J. (2005)** Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170:1021-1027.

- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S und Mihara K. (2009)** Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature cell biology* 11:958-966.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K und Kimura A. (1983)** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163-168.
- James P, Halladay J und Craig EA. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Ji WK, Hatch AL, Merrill RA, Strack S und Higgs HN. (2015)** Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *eLife* 4:e11553.
- Jin P, Duan R, Luo F, Zhang G, Hong SN und Chen EH. (2011)** Competition between Blown fuse and WASP for WIP binding regulates the dynamics of WASP-dependent actin polymerization in vivo. *Developmental cell* 20:623-638.
- Just WW und Peranen J. (2016)** Small GTPases in peroxisome dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1863:1006-1013.
- Kaipa BR, Shao H, Schafer G, Trinkewitz T, Groth V, Liu J, Beck L, Abmayr SM und Onel SF. (2013)** Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *J Cell Sci.*
- Kashatus DF, Lim KH, Brady DC, Pershing NL, Cox AD und Counter CM. (2011)** RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nature cell biology* 13:1108-1115.
- Kesper DA, Stute C, Buttgereit D, Kreiskother N, Vishnu S, Fischbach KF und Renkawitz-Pohl R. (2007)** Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236:404-415.
- Kim B, Kim JS, Yoon Y, Santiago MC, Brown MD und Park JY. (2013)** Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial division impairs myogenic differentiation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 305:R927-938.
- Kim S, Shilagardi K, Zhang S, Hong SN, Sens KL, Bo J, Gonzalez GA und Chen EH. (2007)** A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Developmental cell* 12:571-586.
- Kocherlakota KS, Wu JM, McDermott J und Abmayr SM. (2008)** Analysis of the cell adhesion molecule sticks-and-stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 178:1371-1383.
- Kosaka T und Ikeda K. (1983)** Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *Journal of neurobiology* 14:207-225.
- Koytiger G, Kaushansky A, Gordus A, Rush J, Sorger PK und MacBeath G. (2013)** Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12:1204-1213.
- Krauss RS. (2010)** Regulation of promyogenic signal transduction by cell-cell contact and adhesion. *Experimental cell research* 316:3042-3049.
- Kreegipuu A, Blom N und Brunak S. (1999)** PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res* 27:237-239.

- Kroczek C, Lang C, Brachs S, Grohmann M, Dutting S, Schweizer A, Nitschke L, Feller SM, Jack HM und Mielenz D. (2010)** Swiprosin-1/EFhd2 controls B cell receptor signaling through the assembly of the B cell receptor, Syk, and phospholipase C gamma2 in membrane rafts. *J Immunol* 184:3665-3676.
- Kucherenko MM, Marrone AK, Rishko VM, Yatsenko AS, Klepzig A und Shcherbata HR. (2010)** Paraffin-embedded and frozen sections of Drosophila adult muscles. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Kummerow C, Junker C, Kruse K, Rieger H, Quintana A und Hoth M. (2009)** The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunological reviews* 231:132-147.
- Kurisu S und Takenawa T. (2009)** The WASP and WAVE family proteins. *Genome biology* 10:226.
- Kurisu S und Takenawa T. (2010)** WASP and WAVE family proteins: friends or foes in cancer invasion? *Cancer science* 101:2093-2104.
- Kwon MS, Park KR, Kim YD, Na BR, Kim HR, Choi HJ, Piragyte I, Jeon H, Chung KH, Song WK, Eom SH und Jun CD. (2013)** Swiprosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration. *PLoS One* 8:e71626.
- Landry MC, Champagne C, Boulanger MC, Jette A, Fuchs M, Dziengelewski C und Lavoie JN. (2014)** A functional interplay between the small GTPase Rab11a and mitochondria-shaping proteins regulates mitochondrial positioning and polarization of the actin cytoskeleton downstream of Src family kinases. *The Journal of biological chemistry* 289:2230-2249.
- Lasserre R und Alcover A. (2012)** Microtubule dynamics and signal transduction at the immunological synapse: new partners and new connections. *EMBO J* 31:4100-4102.
- Lawrence PA und Johnston P. (1989)** Analysis of function of the pair-rule genes hairy, even-skipped and fushi tarazu in mosaic Drosophila embryos. *Development* 107:847-853.
- Lee JE, Westrate LM, Wu H, Page C und Voeltz GK. (2016)** Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540:139-143.
- Lemmon MA, Ferguson KM und Schlessinger J. (1996)** PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85:621-624.
- Lin TY, Huang CH, Kao HH, Liou GG, Yeh SR, Cheng CM, Chen MH, Pan RL und Juang JL. (2009)** Abi plays an opposing role to Abl in Drosophila axonogenesis and synaptogenesis. *Development* 136:3099-3107.
- Lindsley DL und Zimm GG. (1992)** The Genome of Drosophila melanogaster. *Academic Press* San Diego.
- Logan MA, Hackett R, Doherty J, Sheehan A, Speese SD und Freeman MR. (2012)** Negative regulation of glial engulfment activity by Draper terminates glial responses to axon injury. *Nature neuroscience* 15:722-730.
- Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR und McMahon HT. (2001)** GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410:231-235.
- Martens S und McMahon HT. (2008)** Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:543-556.
- Massarwa R, Carmon S, Shilo BZ und Schejter ED. (2007)** WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in Drosophila. *Developmental cell* 12:557-569.



- Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingberman E, Nunnari J und Hinshaw JE. (2011)** Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature structural & molecular biology* 18:20-26.
- Mishra P, Carelli V, Manfredi G und Chan DC. (2014)** Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell metabolism* 19:630-641.
- Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J und Baloh RH. (2010)** Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4232-4240.
- Mocsai A, Ruland J und Tybulewicz VL. (2010)** The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature reviews. Immunology* 10:387-402.
- Moline MM, Southern C und Bejsovec A. (1999)** Directionality of wingless protein transport influences epidermal patterning in the Drosophila embryo. *Development* 126:4375-4384.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N und Kupfer A. (1998)** Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-86.
- Moravcevic K, Oxley CL und Lemmon MA. (2012)** Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* 20:15-27.
- Morisato D und Anderson KV. (1995)** Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Annual review of genetics* 29:371-399.
- Mott HR und Owen D. (2015)** Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades? *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 50:85-133.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273.
- Naylor K, Ingberman E, Okreglak V, Marino M, Hinshaw JE und Nunnari J. (2006)** Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *The Journal of biological chemistry* 281:2177-2183.
- Nguyen PV, Marin L und Atwood HL. (1997)** Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *Journal of neurophysiology* 78:281-294.
- Oakes SA. (2007)** Mitochondria control calcium entry at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15171-15172.
- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA und Shattil SJ. (2002)** Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 157:265-275.
- Ochoa GC, Slepnev VI, Neff L, Ringstad N, Takei K, Daniell L, Kim W, Cao H, McNiven M, Baron R und De Camilli P. (2000)** A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol* 150:377-389.
- Önel S-F, Dottermusch C, Sickmann A, Buttgerit D und Renkawitz-Pohl R (2011)** Role of the Actin Cytoskeleton Within FuRMAS During Drosophila Myoblast Fusion and First Functionally Conserved Factors in Vertebrates. In: Larsson L-I (ed) *Cell Fusions*. Springer Netherlands, pp 139-170
- Onel SF und Renkawitz-Pohl R. (2009)** FuRMAS: triggering myoblast fusion in Drosophila. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238:1513-1525.

- Onel SF, Rust MB, Jacob R und Renkawitz-Pohl R. (2014)** Tethering membrane fusion: common and different players in myoblasts and at the synapse. *Journal of neurogenetics* 28:302-315.
- Oren-Suissa M und Podbilewicz B. (2007)** Cell fusion during development. *Trends in cell biology* 17:537-546.
- Otera H und Mihara K. (2011)** Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases* 2:167-172.
- Otera H und Mihara K. (2011)** Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *Journal of biochemistry* 149:241-251.
- Pagliuso A, Cossart P und Stavru F. (2017)** The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Pagliuso A, Cossart P und Stavru F. (2018)** The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75:355-374.
- Papayannopoulos V, Co C, Prehoda KE, Snapper S, Taunton J und Lim WA. (2005)** A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Mol Cell* 17:181-191.
- Park SJ, Suetsugu S, Sagara H und Takenawa T. (2007)** HSP90 cross-links branched actin filaments induced by N-WASP and the Arp2/3 complex. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 12:611-622.
- Paululat A, Holz A und Renkawitz-Pohl R. (1999)** Essential genes for myoblast fusion in Drosophila embryogenesis. *Mechanisms of development* 83:17-26.
- Pawson T, Gish GD und Nash P. (2001)** SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends in cell biology* 11:504-511.
- Pollard TD. (2007)** Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36:451-477.
- Poodry CA und Edgar L. (1979)** Reversible alteration in the neuromuscular junctions of Drosophila melanogaster bearing a temperature-sensitive mutation, shibire. *J Cell Biol* 81:520-527.
- Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ und Pallanck LJ. (2008)** The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1638-1643.
- Praefcke GJ und McMahon HT. (2004)** The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:133-147.
- Putz M, Kesper DA, Buttgerit D und Renkawitz-Pohl R. (2005)** In Drosophila melanogaster, the rolling pebbles isoform 6 (Rols6) is essential for proper Malpighian tubule morphology. *Mechanisms of development* 122:1206-1217.
- Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L und Hoth M. (2006)** Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 281:40302-40309.
- Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC und Hoth M. (2007)** T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14418-14423.
- Rai M, Katti P und Nongthomba U. (2014)** Drosophila Erect wing (Ewg) controls mitochondrial fusion during muscle growth and maintenance by regulation of the Opa1-like gene. *J Cell Sci* 127:191-203.

- Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, Song BD und Schmid SL. (2007)** The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J* 26:559-566.
- Ramesh TP, Kim YD, Kwon MS, Jun CD und Kim SW. (2009)** Swiprosin-1 Regulates Cytokine Expression of Human Mast Cell Line HMC-1 through Actin Remodeling. *Immune network* 9:274-284.
- Ranganayakulu G, Schulz RA und Olson EN. (1996)** Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the Drosophila embryo. *Developmental biology* 176:143-148.
- Ratushny V und Golemis E. (2008)** Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. *BioTechniques* 44:655-662.
- Rau A, Buttgereit D, Holz A, Fetter R, Doberstein SK, Paululat A, Staudt N, Skeath J, Michelson AM und Renkawitz-Pohl R. (2001)** rolling pebbles (rols) is required in Drosophila muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128:5061-5073.
- Reth M. (1989)** Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383-384.
- Richardson B, Beckett K und Baylies M. (2008)** Visualizing new dimensions in Drosophila myoblast fusion. *BioEssays* 30:423-431.
- Richardson BE, Beckett K, Nowak SJ und Baylies MK. (2007)** SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134:4357-4367.
- Robinson DG und Pimpl P. (2014)** Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends in plant science* 19:134-139.
- Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S und Pollard TD. (2001)** Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294:1679-1684.
- Rochlin K, Yu S, Roy S und Baylies MK. (2010)** Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Developmental biology* 341:66-83.
- Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WW, Zurn C und Reth M. (2002)** Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* 10:1057-1069.
- Rotty JD, Wu C und Bear JE. (2013)** New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:7-12.
- Roy S und VijayRaghavan K. (1998)** Patterning muscles using organizers: larval muscle templates and adult myoblasts actively interact to pattern the dorsal longitudinal flight muscles of Drosophila. *J Cell Biol* 141:1135-1145.
- Rubin GM, Hong L, Brokstein P, Evans-Holm M, Frise E, Stapleton M und Harvey DA. (2000)** A Drosophila complementary DNA resource. *Science* 287:2222-2224.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH und Jaenisch R. (1993)** MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
- Rudolf A, Buttgereit D, Jacobs M, Wolfstetter G, Kesper D, Putz M, Berger S, Renkawitz-Pohl R, Holz A und Onel SF. (2014)** Distinct genetic programs guide Drosophila circular and longitudinal visceral myoblast fusion. *BMC cell biology* 15:27.
- Ruiz-Gomez M, Coutts N, Price A, Taylor MV und Bate M. (2000)** Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102:189-198.

- Rushton E, Drysdale R, Abmayr SM, Michelson AM und Bate M. (1995)** Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121:1979-1988.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sambrook J, Maniatis T und Fritsch EF. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez-Pulido L, Martin-Belmonte F, Valencia A und Alonso MA. (2002)** MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in biochemical sciences* 27:599-601.
- Sandoval H, Yao CK, Chen K, Jaiswal M, Donti T, Lin YQ, Bayat V, Xiong B, Zhang K, David G, Charng WL, Yamamoto S, Duraine L, Graham BH und Bellen HJ. (2014)** Mitochondrial fusion but not fission regulates larval growth and synaptic development through steroid hormone production. *eLife* 3.
- Schafer G, Weber S, Holz A, Bogdan S, Schumacher S, Muller A, Renkawitz-Pohl R und Onel SF. (2007)** The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Developmental biology* 304:664-674.
- Scheib JL, Sullivan CS und Carter BD. (2012)** Jedi-1 and MEGF10 signal engulfment of apoptotic neurons through the tyrosine kinase Syk. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:13022-13031.
- Schmid SL und Frolov VA. (2011)** Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annual review of cell and developmental biology* 27:79-105.
- Schrader M. (2006)** Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochimica et biophysica acta* 1763:531-541.
- Schroter RH, Lier S, Holz A, Bogdan S, Klambt C, Beck L und Renkawitz-Pohl R. (2004)** kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131:4501-4509.
- Schroter RH, Buttgereit D, Beck L, Holz A und Renkawitz-Pohl R. (2006)** Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *Drosophila*. *Differentiation; research in biological diversity* 74:608-621.
- Schröter RH. (2006)** Unterschiedliche Rollen des Adaptor-Proteins Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und des Aktin-Regulators Kette/Hem2/Nap1 während der somatischen und viszeralen Myogenese von *Drosophila melanogaster*. *Entwicklungsbiologie- Philipps-Universität Marburg*.
- Schwarz TL. (2013)** Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Sens KL, Zhang S, Jin P, Duan R, Zhang G, Luo F, Parachini L und Chen EH. (2010)** An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol* 191:1013-1027.
- Shelton C, Kocherlakota KS, Zhuang S und Abmayr SM. (2009)** The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136:1159-1168.
- Shin NY, Choi H, Neff L, Wu Y, Saito H, Ferguson SM, De Camilli P und Baron R. (2014)** Dynamin and endocytosis are required for the fusion of osteoclasts and myoblasts. *J Cell Biol* 207:73-89.

- Sickmann A. (2010)** Expressionen von verschiedenen Proteinversionen von Blown fuse sowie Skap2 im Embryo und die mögliche Rolle von Blown fuse in der Myoblastenfusion in *Drosophila melanogaster*. *Entwicklungsbiologie- Phillips-Universität Marburg*.
- Simionescu A und Pavlath GK (2011) Molecular mechanisms of myoblast fusion across species. *Cell Fusion in Health and Disease*. Springer, pp 113-135
- Sink H. (2006)** Muscle development in *Drosophila*. *Springer*,
- Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN und van der Blik AM. (1998)** A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143:351-358.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL und van der Blik AM. (2001)** Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 12:2245-2256.
- Smith MJ, Pozo K, Brickley K und Stephenson FA. (2006)** Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *The Journal of biological chemistry* 281:27216-27228.
- Smurova K und Podbilewicz B. (2016)** RAB-5- and DYNAMIN-1-Mediated Endocytosis of EFF-1 Fusogen Controls Cell-Cell Fusion. *Cell reports* 14:1517-1527.
- Sohn HW, Tolar P und Pierce SK. (2008)** Membrane heterogeneities in the formation of B cell receptor-Lyn kinase microclusters and the immune synapse. *J Cell Biol* 182:367-379.
- Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG und Chan DC. (2009)** Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular biology of the cell* 20:3525-3532.
- St Johnston D. (2002)** The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews. Genetics* 3:176-188.
- Stapleton M, Liao G, Brokstein P, Hong L, Carninci P, Shiraki T, Hayashizaki Y, Champe M, Pacleb J, Wan K, Yu C, Carlson J, George R, Celniker S und Rubin GM. (2002)** The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome research* 12:1294-1300.
- Stowers RS, Megeath LJ, Gorska-Andrzejak J, Meinertzhagen IA und Schwarz TL. (2002)** Axonal transport of mitochondria to synapses depends on milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron* 36:1063-1077.
- Strunkelnberg M, Bonengel B, Moda LM, Hertenstein A, de Couet HG, Ramos RG und Fischbach KF. (2001)** rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128:4229-4239.
- Stynen B, Tourneau H, Tavernier J und Van Dijck P. (2012)** Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:331-382.
- Suetsugu S. (2013)** Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation: allosteric regulation and multimerization on the membrane. *Seminars in cell & developmental biology* 24:267-271.
- Tautz D und Pfeifle C. (1989)** A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98:81-85.
- Tixier V, Bataillé L und Jagla K. (2010)** Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*. *Experimental cell research* 316:3019-3027.
- Tran DH und Berg CA. (2003)** bullwinkle and shark regulate dorsal-appendage morphogenesis in *Drosophila* oogenesis. *Development* 130:6273-6282.

- Tsang E, Giannetti AM, Shaw D, Dinh M, Tse JK, Gandhi S, Ho H, Wang S, Papp E und Bradshaw JM. (2008)** Molecular mechanism of the Syk activation switch. *The Journal of biological chemistry* 283:32650-32659.
- van der Blik AM und Meyerowitz EM. (1991)** Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* 351:411-414.
- van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM und Schmid SL. (1993)** Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122:553-563.
- van der Blik AM. (1999)** Functional diversity in the dynamin family. *Trends in cell biology* 9:96-102.
- van der Blik AM und Payne GS. (2010)** Dynamin subunit interactions revealed. *Developmental cell* 18:687-688.
- Vega IE, Traverso EE, Ferrer-Acosta Y, Matos E, Colon M, Gonzalez J, Dickson D, Hutton M, Lewis J und Yen SH. (2008)** A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy. *Journal of neurochemistry* 106:96-106.
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y und Bellen HJ. (2005)** Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47:365-378.
- Vos M, Lauwers E und Verstreken P. (2010)** Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2:139.
- Vuadens F, Rufer N, Kress A, Cortes P, Schneider P und Tissot JD. (2004)** Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes. *Proteomics* 4:2216-2220.
- Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M und Sesaki H. (2009)** The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186:805-816.
- Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S und Vidal M. (2000)** GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in enzymology* 328:575-592.
- Wang H, Yi J, Li X, Xiao Y, Dhakal K und Zhou J. (2017)** ALS-associated mutation SOD1G93A leads to abnormal mitochondrial dynamics in osteocytes. *Bone*.
- Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F und Wang X. (2012)** The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148:228-243.
- Wang ZH, Clark C und Geisbrecht ER. (2016)** Analysis of mitochondrial structure and function in the *Drosophila* larval musculature. *Mitochondrion* 26:33-42.
- Warnock DE, Hinshaw JE und Schmid SL. (1996)** Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *The Journal of biological chemistry* 271:22310-22314.
- Weber M, Treanor B, Depoil D, Shinohara H, Harwood NE, Hikida M, Kurosaki T und Batista FD. (2008)** Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *The Journal of experimental medicine* 205:853-868.
- Weitkunat M und Schnorrer F. (2014)** A guide to study *Drosophila* muscle biology. *Methods* 68:2-14.
- Welch MD und Mullins RD. (2002)** Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology* 18:247-288.

- Westermann B. (2010)** Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:872-884.
- Wienands J, Schweikert J, Wollscheid B, Jumaa H, Nielsen PJ und Reth M. (1998)** SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *The Journal of experimental medicine* 188:791-795.
- Woodside DG, Obergfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ und Ginsberg MH. (2001)** Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* 11:1799-1804.
- Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H und Lu B. (2008)** Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7070-7075.
- Yoon Y, Pitts KR und McNiven MA. (2001)** Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Molecular biology of the cell* 12:2894-2905.
- Zhu PP, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M und Blackstone C. (2004)** Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *The Journal of biological chemistry* 279:35967-35974.
- Ziegenfuss JS, Biswas R, Avery MA, Hong K, Sheehan AE, Yeung YG, Stanley ER und Freeman MR. (2008)** Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature* 453:935-939.
- Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP und Teitelbaum SL. (2007)** Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 176:877-888.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM und Vance JM. (2004)** Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics* 36:449-451.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abi	Abelson interactor protein
Amp	Ampicillin
APF	after puparianformation
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arf6	ADP-ribosylation factor 6
BCR	B cell receptor
BiFC	bimolekulare Floureszenzkomplementation (Bimolecular Flourescence Complementation)
bp	Basenpaare
Brk 1/Hspc300	Breast tumor kinase/hermatopoietic stem/progenitor cell protein 300
BS	Bindestelle
cSMAC	central supramolecular activation complex
DIG	Digoxigenin
DLM	dorsal-longitudinalen Muskeln
DLM	dorsal-longitudinalen Muskeln
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Drp1	dynammin-related protein 1
Duf	Dumbfounded
DVM	dorso-ventralen Muskeln
ECP	exo-endo cycling pool
ECP	exo-endo cycling pool
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
F-Aktin	filamentösen-Aktin
FC	Founder Zelle (Founder Cell)
FCM	fusionskompetente Myoblaste (fusion competent myoblast)
FIS1	fission protein 1
F-PBS	Formaldehyd-PBS
FuRMAS	Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure
FuRMAS	fusion-restricted myogenic adhesive structure



GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (Guanine nucleotide-Exchange Factor)
GEF	guanine-nucleotide exchange faktor
GTPase	guanosin triphosphatase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-11
Ig	Immunoglobulin
IgSF	Immunoglobulin-Superfamilie
IRM	irre cell recognition module
ITAM	immunreceptor-tyrosin-based-activation-motif
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
MeOH	Methanol
MFF	mitochondrial fission factor
min	Minute
MOM	mitochondrialen Membran
mRNA	„messenger“ – Ribonukleinsäure
NBT	4-Nitrotetrazoliumchlorid
NPF	kernbildungsfördernde Faktoren (Nucleation Promoting Factor)
NPF	nucleation promoting factors
OD	optische Dichte
OPA1	Protein optic atrophy 1
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	PBS versetzt mit 0,5% Tris
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
PH	Pleckstrin-Homologie
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase C $\gamma$ 2
pro	Volumen
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reverse pool
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds Per Minute)
RRP	readily releasable pool
Rst	Roughest
RT	Raumtemperatur
Scar	suppressor of cyclic AMP repressor
Shark	Syk homologue SH2 domain ankyrin repeat kinase
	SH2 domain-containing leukocyte adapter protein of
SLP-65	65kDa
Sns	Sticks and Stones
SOCE	store-operated calcium entry

Sra1	Specifically Rac1-associated protein
STIM	stromal interaction moleküle
Syk	spleen tyrosine kinase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
U	Unit
UAS	Upstream Activating Sequence
v/v	Volumen
Vol.	Volumenanteil
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Familie
Wip	WASp interacting protein
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Körperwandmuskulatur in <i>D. melanogaster</i> und schematische Übersicht über alle Muskeln pro Hemisegment. ....	6
Abb. 2: Schematische Übersicht über die Migration der Myoblasten von der Imaginalscheibe zu den Vorläuferzellen der DLM. ....	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der somatischen Myoblastenfusion auf ultrastruktureller Ebene. ....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der FuRMAS. ....	11
Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des WASp/Wip Komplexes. ....	13
Abb. 6: Zusammenfassender Überblick über an der Myoblastenfusion von <i>Drosophila</i> beteiligten Proteine. ....	15
Abb. 7: Schematische Übersicht über die Proteinstruktur von Blow. ....	16
Abb. 8: Übersicht über die Lokalisation von DSwip-1 in verschiedenen Mutanten. ....	20
Abb. 9: Schema einer Umbalancierung. ....	40
Abb. 10: Schema einer Mehrfachmarkierung. ....	41
Abb. 11: Schema für die Etablierung einer Doppelmutante. ....	41
Abb. 12: Kreuzungsschema für die Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie. ....	42
Abb. 13: Schematische Darstellung des UAS-Gal4 Systems. ....	45
Abb. 14: Schematische Darstellung des Hefe-2-Hybrid Systems. ....	59
Abb. 15: Die Expression von Blow-Deletionskonstrukten mit Hilfe von Mef2Gal4 führt zu leichten Defekten in der Formation der Muskeln. ....	70
Abb. 16: Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Shark und Syk. ....	72
Abb. 17: Alle Shark Deletionskonstrukte interagieren mit Blow. ....	74
Abb. 18: Der C-terminale Bereich von Blow scheint für eine Interaktion mit Shark nicht ausreichend zu sein. ....	75
Abb. 19: Auch der N-terminale Bereich von Blow scheint für eine Interaktion mit Shark nicht ausreichend zu sein. ....	76
Abb. 20: <i>shark<sup>l</sup></i> Mutanten weisen keinen Fusionsdefekt auf. ....	78
Abb. 21: Die Expression von <i>Mef2-Gal4&gt;&gt;UAS-shark Δ kin-mcherry</i> führt zu leichten Fusionsstörungen. ....	79

Abb. 22: Die Expression von <i>UAS-shark Δ Ank mcherry</i> führt zu einem starken Defekten während der Muskelentwicklung.....	81
Abb. 23: Die Expression von <i>UAS-shark Δ kin mcherry</i> mittels <i>actin88Gal4</i> scheint die interfilamentäre Verbindung zu beeinflussen.....	83
Abb. 24: Die durchschnittliche Flugfähigkeit in <i>1151Gal4&gt;&gt;UAS-shark Δ kin-mcherry</i> und <i>Actin88Gal4&gt;&gt;UAS-shark Δ kin-mcherry</i> getriebenen Fliegen ist beeinträchtigt. ....	84
Abb. 25: Longitudinal und transversalen Schnitte an <i>Actin88Gal4</i> getriebenen <i>UAS-shark Δ kin mcherry</i> bestätigen einen Defekt in dem interfilamentären Zusammenhalt.....	86
Abb. 26: Die durchschnittliche Flugfähigkeit in <i>Actin88Gal4&gt;&gt;UAS-shark Δ kin-mcherry</i> getriebenen Fliegen ist beeinträchtigt.....	87
Abb. 27: Zwischen Shark und Sns konnte keine Protein-Protein Interaktion festgestellt werden.	89
Abb. 28: Shark scheint genetisch mit Sns zu interagieren. ....	91
Abb. 29: <i>drp1 in situ</i> Hybridisierung zeigt eine maternale Komponente, sowie eine ubiquitäre Expression. ....	94
Abb. 30: Die GTPase-Domäne von Drp1 scheint für die Interaktion mit Blow essentiell zu sein. ....	95
Abb. 31: Weder der N-terminale noch der C-terminale Bereich sind in der Lage die Interaktion mit Drp1 zu vermitteln. ....	97
Abb. 32: <i>drp<sup>l</sup></i> Mutanten weisen einem leichten Fusionsdefekt auf.....	98
Abb. 33: Drp1 und Blow scheinen genetisch miteinander zu interagieren. ....	99
Abb. 34: Die Expression von <i>Mef2-Gal4&gt;&gt;UAS-shibire-GED Δ PRR-mcherry</i> führt zu einem starken Defekt in der Entwicklung der Muskulatur.....	101
Abb. 35: Die Expression von <i>UAS-drp1-fl-mcherry</i> in Myoblasten führt zu leichten Fusionsdefekten.....	103
Abb. 36: Der Verlust der GED-Domäne von Drp1 führt zu einem stärkeren Phänotyp.....	105
Abb. 37: Die Expression von <i>UAS-drp1-fl-mcherry</i> , <i>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry</i> und <i>UAS-drp1 Δ GED-mcherry</i> führt keinem Defekt in der Anheftung der Muskeln.....	106
Abb. 38: Expression von <i>Mef2-Gal4&gt;&gt;UAS-drp1-T637D-mcherry</i> führt zu einem leichten Defekt in der Formation der Muskeln. ....	108
Abb. 39: <i>UAS-Drp1-fl-mCherry</i> , <i>UAS-Drp1 Δ GTPase-mCherry</i> und <i>UAS-Drp1 Δ GED-mCherry</i> lokalisieren in punktuert im Zytoplasma.....	110

Abb. 40: Drp1 fl mCherry Co-lokalisiert mit endogenen Drp1, Mitochondrien und GM130. Transfektion von SL2 Zellen.....	112
Abb. 41: Die Expression von <i>UAS-drp1 Δ GTPase-mcherry</i> und <i>UAS-drp1 Δ GED-mcherry</i> mittels Actin88Gal4 scheint den interfilamentären Verbindung zu beeinflussen. ....	115
Abb. 42: Die Expression von <i>UAS-drp1-fl</i> , <i>UAS-drp1 Δ GTPase</i> und <i>UAS-drp1 Δ GED</i> resultiert in einer verminderten Flugfähigkeit. ....	116
Abb. 43: Transversale und longitudinale Paraffinschnitte an <i>Actin88Gal4&gt;&gt;UAS-drpΔ GTPase-myc</i> und <i>Actin88Gal4&gt;&gt;UAS-drp1 Δ GED-myc</i> getriebenen Fliegen zeigen einen starken Defekt in der Entwicklung der adulten DLM. ....	118
Abb. 44: Die Expression von <i>UAS-drp1-fl</i> , <i>UAS-drp1 Δ GTPase</i> , <i>UAS-drp1 Δ GED</i> , <i>UAS-drp1 Δ GED-myc</i> , <i>UAS-drp1-T637D-myc</i> und Drp1 RNAi resultiert in einer verminderten Flugfähigkeit.....	120
Abb. 45: Schematische Darstellung der berücksichtigten Fusionsphasen von FCM. ....	122
Abb. 46: Die Lokalisation der Mitochondrien scheint während des Fusionsprozesses in verschiedenen Mutanten sehr dynamisch zu sein.....	124
Abb. 47: Die Lokalisation der Mitochondrien scheint während des Fusionsprozesses in verschiedenen Mutanten sehr dynamisch zu sein.....	126
Abb. 48: Die Relokalisation von Mitochondrien scheint dynamisch zu sein.....	127
Abb. 49: Zusammenfassende schematische Übersicht über die dynamische Lokalisation von Mitochondrien während der Myoblastenfusion.....	128
Abb. 50: Differenzierung von primären Mausmyoblasten geht mit einer Veränderung der Mitochondrien Morphologie einher.....	129
Abb. 51: Die Inhibition von Drp1 beeinträchtigt die Differenzierung von primären Mausmyoblasten.....	131
Abb. 52: <i>marf</i> -Mutanten weisen einen starken Fusionsdefekt auf. ....	133
Abb. 53: Schematische Übersicht über die Blow Protein-Domänen.....	138
Abb. 54: Model zur möglichen Rolle von Drp1 und Shark während der embryonalen Myoblastenfusion. . ....	161
Abb. 55: Model zur möglichen Rolle von Shark während der embryonalen Muskelanheftung. ....	162

#### 6.4 Erklärung gem. § 5 der Promotionsordnung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle von Blow und Drp1 bei der Auflösung des Präfusionskomplexes am Zell-Zell Kontakt während der Myoblastenfusion von *Drosophila*“

unter der Leitung von Frau Dr. Susanne Önel am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

---

(Michaela Papendieken)







